UC-NRLF
B 3 778 057

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO

120

Biochemische Zeitschrift

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M.,
E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, M. Bergmann-Berlin-Dahlem, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., F. Czapek-Leipzig, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, J. Feigl-Hamburg, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hári-Budapest, E. Hägglund-Åbo, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin-Dahlem, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, A. Koch-Göttingen, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Greifswald, L. Michaelis-Berlin, H. Molisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, J. K. Parnas-Lemberg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-St. Petersburg, T. Sasaki-Tokio, A. Scheunert-Berlin, A. Schloßmann-Düsseldorf, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Liestal, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., K. Suto-Kanazawa, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, P. Trendelenburg-Rostock, O. Warburg-Berlin, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundzwanzigster Band

Ausgegeben am 3. August 1921

Berlin

Verlag von Julius Springer

1921

U.C. MEDICAL CENTER LIBR
JAN 2 1962
San Francisco, 22

120. Band. **Inhaltsverzeichnis.** 120. Band.

Seite

Iwanoff, Nicolaus N. Über die Verwandlung stickstoffhaltiger Substanzen bei den Endphasen der Hefenautolyse 1

Iwanoff, Nicolaus N. Über Eiweißspaltung in Hefen während der Gärung 25

Iwanoff, Nicolaus N. Über den Einfluß der Gärungsprodukte auf den Zerfall der Eiweißstoffe in den Hefen 62

Klein, W. und **Maria Steuber.** Die elementaranalytische Methode der direkten Bestimmung von Kohlensäure und Sauerstoff in der Berthelotschen Bombe und ihre Bedeutung für Stoffwechselbilanzen speziell beim Herbivoren 81

Traube, J. und **R. Somogyi.** Zur Theorie der Desinfektion 90

Somogyi, R. Wirkung von Säuren auf die Hefegärung 100

Somogyi, R. Quellung von Fibrin durch Säuren 103

Traube, J. Ein neues Viscostalagmometer zur Bestimmung der Oberflächenspannung und Reibung für Flüssigkeiten von verschiedenster Reibung 106

Traube, J. Nochmals die Wasserstoffionen 108

Traube, J. und **P. Klein.** Experimentelle Beiträge zur Theorie der Narkose 111

Kahho, Hugo. Zur Kenntnis der Neutralsalzwirkungen auf das Pflanzenplasma. II. Mitteilung 125

Führer, H. Die Wirkungsstärke der Narkotica. I. Versuche am isolierten Froschherzen 143

Schenker, Robert. Zur Kenntnis der Lipase von Apergillus niger (van Tiegh.) 164

Meißner, R. Zur Beschleunigung der Blutgerinnung durch Euphyllin 197

Joachimoglu, Georg. Die Wirkung einiger Verwandten des Chloroforms mit besonderer Berücksichtigung der Traubeschen Theorie über die Wirkung der Narkotica der Fettreihe 203

Katsch, G. und **Géza Német.** Über Alkaptonchromogene 212

Fränkel, Sigmund und **Emil Feldsberg.** Über eine neue Funktion des tryptischen Fermentes (Anhydrase) und über die Darstellung von d-Tyrosinanhydrid und d-Tryptophananhydrid aus den tryptischen Verdauungsprodukten 218

Bachem, C. und **H. Kriens.** Über Jodabspaltung aus Jodoform und dessen Ersatzpräparaten 230

Sarin, E. Beiträge zur Chemie der Bildung und Reifung des Bienenhonigs 250

Sarin, E. Einfluß organischer Säuren auf die Bildung und Reifung des Zuckerhonigs 259

Wachtel, Curt. Nachweis und Bestimmung des Morphins und anderer Alkaloide in tierischen Ausscheidungen und Organen 265

Wacker, Leonh. Kohlensäuredruck oder Eiweißquellung als Ursache der Muskelkontraktion? II. 284

Voigt, J. und **M. Fritz.** Versuche mit kolloiden Metallen zum Studium der Funktionsweise der Nieren 303

Autorenverzeichnis 319

Über die Verwandlung stickstoffhaltiger Substanzen bei den Endphasen der Hefenautolyse.

Von

Nicolaus N. Iwanoff.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Petersburg.)

(Eingegangen am 23. April 1921.)

Als es klar wurde, daß das proteolytische Hefeferment ein System von Enzymen[1]) darstellt, unter denen die Individualität der Protease und der Peptase mit voller Sicherheit nachgewiesen worden ist, sollte man auf den Versuch verzichten, ein einziges Medium zu finden, welches für die Tätigkeit beider Fermente zugleich optimal wäre.

Protease und Peptase[2]) verhalten sich verschieden bei Erhitzung, erstere hält eine Temperatur aus, bei welcher die zweite inaktiv wird. Auch sind die optimalen Konzentrationen der H-Ionen für die Arbeit der Protease und der Peptase ungleich. Sämtliche frühere Angaben, welche davon sprachen, daß eine sauere Lösung für die Wirkung des proteolytischen Fermentes am vorteilhaftesten ist, müssen heutzutage auf die Protease bezogen werden, während für die Peptase eine schwach alkalische Reaktion am günstigsten erscheint.

Die Einführung von sauerem Phosphat in die Reaktion beschleunigte nur die Arbeit der Protease und beförderte die Anreicherung von Produkten des ursprünglichen Eiweißzerfalles — namentlich von Peptiden. Die Anreicherung dieser Produkte wird nicht nur durch eine besonders vorteilhafte Konzentration der H-Ionen erklärt, sondern auch dadurch, daß diese Bedingungen für die Wirkung der Peptase unvorteilhaft sind. Es ist daher von großem Interesse zu untersuchen, ob es möglich ist, die Lösungs-

[1]) Vines, Ann. of Bot. **18**, 289. 1904; **19**, 145 u. 171. 1905. N. N. Iwanoff, Zeitschr. f. Gärungsphys. **1**, 230. 1912; Biochemical Journ. **12**. 1918; K. Dernby, diese Zeitschr. **81**, 107. 1917.

[2]) Ich habe als Protease dasjenige Ferment bezeichnet (Biochemical Journ. **12**. 1918), welches Eiweißstoffe in Peptone verwandelt, während Peptase ein Ferment ist, welches Peptone bis zu den Aminosäuren aufspaltet.

bedingungen während der Dauer des Eiweißzerfalles zu ändern. In denjenigen Fällen z. B., in denen der Eiweißzerfall sein Ende beinahe erreicht und sich ein großes Quantum von Produkten des ursprünglichen Eiweißzerfalles gebildet hat, könnte eine Veränderung der saueren Reaktion in eine schwach alkalische zu interessanten Folgen führen. Es würden sich in diesem Falle folgende Möglichkeiten eröffnen: Entweder wird die schwach alkalische Reaktion die Arbeit der Peptase befördern, indem die Wirkung der Protease eingestellt oder abgeschwächt ist, oder die analytische Arbeit der Protease in eine synthetische umwandeln, falls die Peptase inaktiv geworden ist. Wir wissen nicht, warum die synthetische Arbeit eines Fermentes in einer lebenden Zelle nach deren Absterben sofort scharf abbricht und in die analytische übergeht, wie es bei der Hefeautolyse beobachtet wird. Wir sprechen in diesem Falle von der ordnungslosen, unkoordinierten fermentativen Arbeit; es ist uns nicht völlig klar, welche Ursachen die Fermente zwingen, von der Synthese zur Analyse überzugehen und warum der Übergang des Fermentes aus dem zymogenen in das aktive Stadium erfolgt. Wir vermuten, daß die Veränderung der Konzentration der H-Ionen nach dem Absterben der Zelle als einer der Faktoren einer solchen Verwandlung auftritt. In der lebenden Hefezelle ist der saure Zellensaft vom Protoplasma abgesondert, welches eine schwach alkalische oder eine neutrale Reaktion besitzt. Bei ihrem Tode wird die Reaktion sauer, weil sich die beiden Bestandteile vermischen. Neutralisiert man eine solche Mischung oder macht sie gar schwach alkalisch, so werden die Eiweißspaltungsprozesse gleich bei Beginn stark abgeschwächt. Freilich darf man sich nicht auf den Grundsatz festlegen, daß jeder für die analytische Arbeit vorteilhafte Einfluß auf die synthetische Tätigkeit des Fermentes eine negative Wirkung ausüben wird und umgekehrt, doch darf erwartet werden, daß eine schwach alkalische Reaktion für die Eiweißsynthese besser geeignet ist als eine saure, weil ja das Protoplasma, in dem sich ähnliche Prozesse vollziehen, auch eine schwach alkalische Reaktion aufweist. Dies alles hatte ich in Erwägung gezogen, als ich eine Reihe orientierender Versuche anstellte, welche ich im Jahre 1914 beschrieben habe[1]).

Für die Arbeiten wurde Hefanol benutzt. Die Autolyse dieses Hefepräparates vollzog sich bei hoher Temperatur von 53—60° C. Zur Erreichung der saueren Reaktion habe ich KH_2PO_4 gebraucht, während für die alkalische K_2HPO_4 benutzt wurde. Ich fand damals, daß, wenn der Eiweißzerfall bei der Hefeautolyse bis zu einer gewissen Grenze geht, nach der Alkalisierung der Lösung mit K_2HPO_4 eine Anreicherung des nach Stutzer bestimmten Stickstoffs beobachtet werden kann. Diese Erhöhung des Eiweißstickstoffs ging mit einer Stickstoffverminderung im Niederschlage von essigsaurem Blei einher, weshalb ich schon damals die Vermutung ausgesprochen hatte, daß wir es hier mit der fermentativen Synthese von Eiweiß aus den Produkten seines ursprünglichen Zerfalles zu tun haben.

---

[1]) N. N. Iwanoff, Über synthetische Prozesse der Hefeautolyse. Diese Zeitschr. **63**, 359. 1914.

Auch habe ich damals vermutet, daß wahrscheinlich außer der alkalischen Reaktion noch andere Faktoren für die Anreicherung von Stickstoff im Kupferhydroxydniederschlage verantwortlich zu machen sind. Des weiteren bedurften meine ursprünglichen Schlußfolgerungen einer Ergänzung und Revision auf Grund eines neuen Versuchsmaterials. Der fermentative Charakter der Erscheinung sollte noch bewiesen werden und wenn sich hier Eiweiß synthetisch bildet, so sollte sich eine Verminderung des Stickstoffs der Aminogruppen zeigen; nur diese letzte Erscheinung könnte als direkter Beweis für die Eiweißsynthese dienen. Gleichzeitig mit meiner Arbeit erschien eine Abhandlung von S. Kostitschew und W. Brilliant[1]), in der die Verfasser ebenfalls auf die Möglichkeit hinwiesen, eine Erhöhung des Stickstoffes im Kupferhydroxydniederschlage zu erreichen, nachdem der Eiweißzerfall eine gewisse Grenze erreicht hat. Die Endresultate der Verfasser stimmen mit den meinigen überein, doch unterscheidet sich der Weg, den sie für den Eintritt ihrer Synthesen gewählt haben, so stark von dem meinigen, daß an der Verschiedenartigkeit der von uns beobachteten Vorgänge nicht zu zweifeln ist. Die Verfasser führten den Zerfall des Eiweißes im Hefemacerationssaft bis zu Ende, setzten darauf Soda bis zur Neutralisation[2]) oder schwachen Alkalescenz hinzu und ließen dann, nachdem je 4 g Glucose pro 10 ccm Saft eingetragen waren, noch einige Tage bei 34° C stehen; die Fällung nach Stutzer wies auf eine Erhöhung von Stickstoff im Kupferniederschlage hin. Bei denjenigen Portionen, welche nach der Alkalisierung mit kohlensaurem Ammonium im Vakuum-Exsicator aufbewahrt worden waren, fand die Eiweißsynthese in größerem Maßstabe statt als bei Kontrollportionen, die unter Normaldruck gelassen wurden. Wenn die Autolyse 24 Stunden dauerte und der Zerfall eine bestimmte Grenze nicht erreichte, so wurde keine Synthese erzielt, auch in dem Falle nicht, als die Portionen längere Zeit in Berührung mit Glykose gelassen wurden. Die Abhängigkeit der synthetischen Prozesse vom Eiweißgehalt im Safte spricht nach Kostitschew und Brilliants Meinung dafür, daß die Synthese unter Einfluß des proteolytischen Fermentes verläuft. Besonders erscheint die Angabe der Verfasser bemerkenswert, daß das Filtrat nach der Fällung mit essigsaurem Blei Stickstoff einer unbestimmten Art enthält, welcher in den $Cu(OH)_2$-Niederschlag übergeht. Die Verfasser erwägen die Möglichkeit, daß die bei synthetischen Prozessen entstehenden Substanzen mit den im frischen Saft enthaltenen Eiweißstoffen nicht identisch sind.

Im folgenden berichte ich über eine Reihe von Versuchen zur Aufklärung der Natur der von mir beobachteten Erscheinung. Dient das Quantum der freiwerdenden Aminogruppe als Maß des tiefen Eiweißzerfalles, so soll die Synthese der Eiweißstoffe eine Verminderung des Quantums von Aminstickstoff zur Folge haben.

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **91**, 372. 1914.

[2]) Zur Beschleunigung der Autolyse setzten die Verfasser Essigsäure hinzu, deren Menge 0,33% der Saftmenge ausmachte.

Sonach war zu verfolgen, was mit den Aminosäuren bei Anreicherung des nach Stutzer gefällten Stickstoffs in einer alkalischen Lösung geschieht. Geht die Synthese der Eiweißstoffe auf Kosten der Aminosäuren vor sich, so wird das sofort an der Menge des nach van Slyke bestimmten Stickstoffs bemerkt werden; wir würden eine Verminderung dieses Stickstoffs beobachten. Als Material für nachstehende Versuche dienten Hefesaft, Hefanol, Zymin. Als Antisepticum wurde wie früher Thymol und Toluol hinzugesetzt. Zur Veränderung der Reaktion wurde KOH hinzugesetzt, welches in einigen Versuchen das zuvor hinzugefügte KH_2PO_4 in das K_2HPO_4 verwandelte.

Versuch 1: Portionen Hefemacerationssaft je 5 ccm; dazu wurde je 1 ccm 12,5 proz. KH_2PO_4 und Toluol hinzugesetzt. Autolyse bei 46° C.

	N-Mengen in mg n. van Slyke	N-Mengen in mg n. Stutzer
1. 5 ccm Saft, Kontrollportion	10,8	28,6
2. desgl. nach 100 Stunden Autolyse bei 46° C	18,7	12,9
3. desgl., desgl, doch wurde nach Beendigung der 100 Stunden Autolyse bei 46° C 0,5 ccm 10 proz. KOH zugesetzt und weitere 30 Stunden autolysiert .	18,3	17,1

Der Stickstoff nach Stutzer hat sich um 4,2 mg (17,1—12,9) erhöht, doch ist die Verminderung von Stickstoff nach van Slyke kaum merkbar. Würde hier die Eiweißsynthese aus Aminosäuren vonstatten gehen, so müßten die Zahlen der Stickstoffanreicherung nach Stutzer und der Stickstoffverminderung nach van Slyke übereinstimmen. Ihre Verschiedenheit spricht deutlich dafür, daß die neu gebildete Substanz, welche durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen wird, nicht aus Aminosäuren entstanden ist. Die Vermutung, daß die Anreicherung dieser Substanz mit den Produkten des ursprünglichen Eiweißzerfalles eng verknüpft ist, hat viel mehr Gründe für sich.

In weiteren Versuchen habe ich die optimalen Verhältnisse für den Eiweißzerfall geändert; insbesondere wurde die Temperatur von 42—44° C auf 60—62° C erhöht, bei der sich analytische Prozesse überhaupt verlangsamen. B. Robertson[1]) benutzte höhere Temperaturen zur Verbesserung der Paranucleinsynthese und

[1]) B. Robertson, Journ. of biol. chem. **5**, 393. 1908—09; Biochemical Journ. **3**, 95. 1907.

erhielt höhere Ausbeuten; der Verfasser stellte das Paranuclein aus Produkten der Pepsinhydrolyse von Casein synthetisch dar. Eine ganze Reihe von Versuchen, die ich ausgeführt habe, zeigte, daß man nicht immer bei der Autolyse nach Alkalisierung der Lösung eine Stickstofferhöhung nach Stutzer erreichen kann; wir können zu negativen Resultaten kommen, wenn der Zerfall des Eiweißes zu weit fortgeschritten ist und sich die Zwischenprodukte zwischen autolytischen Verbindungen im Verlaufe des Prozesses zersetzt haben. Es stellte sich auch heraus, daß die Erscheinung der Stickstoffsynthese nach Stutzer beim Gebrauch Lebedewscher Hefe schwerer zu erreichen ist, da sie im Macerationssaft eine besonders starke Peptase enthalten. Nur im Anfangsstadium der Autolyse konnten höhere Eiweißzerfallsprodukte nachgewiesen werden und zwar in geringerer Menge als bei den anderen Hefearten. Deshalb konnte man eine Anreicherung von Stickstoff im Kupferhydroxydniederschlage nicht immer hervorrufen; für den Verlauf dieses Prozesses ist es nötig, daß der Eiweißzerfall die Grenze von 50% übersteigt; wenn die Autolyse erst bei einem Eiweißzerfall von 83% unterbrochen wurde, konnte keine Stickstofferhöhung im Kupferniederschlage mehr erzielt werden, obgleich die üblichen Bedingungen (alkalische Reaktion und nachfolgende Autolyse) innegehalten worden waren. Dagegen wurde eine Stickstoffverminderung beobachtet.

Bei Durchsicht der Protokolle meiner Versuche habe ich bemerkt, daß eine maximale Stickstoffanreicherung in denjenigen Fällen beobachtet wird, in welchen der Eiweißzerfall die Grenze von 50% etwas übersteigt, also dann, wenn sich die Produkte des ursprünglichen Eiweißzerfalles noch nicht zersetzt haben können.

In der nachstehenden Tabelle, in der Resultate einiger Versuche mit Trockenhefen zusammengestellt sind, ging die Autolyse in sämtlichen Versuchen zuerst während verschiedener Zeit von 24 bis 72 Stunden bei 40—45° C vor sich (Kontrollportionen); darauf wurde die Lösung durch Zusatz von K_2HPO_4 alkalisiert und die Autolyse während weiterer 24 Stunden bei 60° C weitergeführt (Versuchsportionen). Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß je weiter der Eiweißzerfall die Grenze von 50% überstieg, desto geringer die Stickstofferhöhung im Kupferniederschlage der Versuchsportion wurde.

Tabelle I.

Portionen	N-Quantum im $Cu(OH)_2$-Niederschlage in mg			Eiweißzerfall in %		
	Kontrollp.	Versuchsp.	Differenz	Kontrollp.	Versuchsp.	Differenz
A	25,7	34,2	+8.5	56,0	40.3	+15,7
B	30.4	32,8	+2,4	65,6	60.8	+ 4,8
C	86,5	92,3	+5.8	71,2	69,2	+ 2,0
D	48,8	48,4	0	80.5	80,6	0
E	31.8	28,9	−2,9	83.0	85.0	− 2,0

Als Beispiel führe ich einen der Versuche, in dem die Stickstofferhöhung im $Cu(OH)_2$-Niederschlage 13,2 mg erreichte, ausführlich an.

Versuch 2: 2 Portionen Trockenhefe zu je 4 g mit einem Inhalte an Eiweißstickstoff von 306,9 und 302,1 mg wurden mit 40 ccm Wasser und Toluol zur Autolyse aufgestellt. Die Berechnung ist auf 300 mg Eiweißstickstoff pro Portion gemacht worden. Zuerst dauerte die Analyse 45 Stdn. bei 35° C (Kontrollportion), darauf wurde 2 g K_2HPO_4 zugesetzt und weitere 24 Stunden bei 60° C autolysiert (Versuchsportion).

	N-Quantum im Niederschlage in mg	Eiweißzerfall in %
Kontrollportion	102,4	65,9
Versuchsportion	115,6	61,5
Differenz	+ 13,2	+ 4,4

Sonach wird auch mit Trockenhefen eine Stickstoffanreicherung nach Stutzer erhalten, doch muß dafür gesorgt werden, daß der Eiweißzerfall nicht zu weit geht, namentlich nicht bis zu dem Grade, bei welchen sich sämtliche, oder der größte Teil der Zwischenverbindungen peptiden Charakters im allgemeinen Gange der Proteolyse gespalten haben.

Meine weiteren Versuche überzeugten mich von einer großen Verbreitung der von mir beschriebenen Erscheinung, welche auch bei der Verdauung von Edestin durch Takodiastase beobachtet wurde[1]); so fiel in einem Versuche, nach der Verdauung, das Quantum von Eiweißstickstoff von 212,8 mg bis zu 100,7 mg, und erhöhte sich darauf wieder bis 112,6 mg, als die Portion mit K_2HPO_4 alkalisiert und weitere 24 Stunden bei 65° C autolysiert wurde. Dasselbe habe ich auch bei der Autolyse des Champignonsaftes beobachtet.

[1]) Takadiastase, ein Präparat von Parke & Davis, enthält ein starkwirkendes proteolytisches Enzym.

In der zweiten Arbeit über die Synthese stickstoffhaltiger Substanzen nach der Hefeautolyse notierten auch S. Kostitschew und W. Brilliant[1]) die Verschiedenheit der Verfahren, welche ich und sie benutzt haben, um ein Anwachsen des nach der Hefeautolyse nach Stutzer bestimmten Stickstoffs zu erreichen. Im Widerspruch mit meiner Vermutung, daß die Stickstoffanreicherung im Kupferhydroxydniederschlage durch die Bildung von Zwischenverbindungen des Eiweißzerfalles, namentlich von Albumosen und Peptonen zu erklären ist, behaupten die Verfasser, daß sie diese Zwischenverbindungen nicht entdecken konnten.

Die Verfasser führten Versuche mit nach Lebedew getrockneten Hefen aus, welche, wie bereits oben erwähnt, an Peptase sehr reich sind; die Bedingungen der Autolyse — 34° C — waren ebenfalls für die Arbeit der Peptase sehr vorteilhaft. Es ist sonach durchaus erklärlich, daß Kostitschew und Brilliant nach 3tägiger Autolyse in ihren Versuchen keine Produkte des ursprünglichen Eiweißzerfalles erhalten haben; doch haben die Verfasser, wie sie selbst bemerken, bei einer kurzdauernden 24stündigen Autolyse bei 34, 45, 55° C schon Stickstoff vom Peptoncharakter beobachtet. Bei dem schnellen Tempo der Eiweißzerspaltung hat sich ein großer Teil der Albumosen und Peptone zersetzt und man muß deshalb auch erwarten, daß unter diesen Bedingungen kein Stickstoffanwachs nach Stutzer infolge Auftretens von Produkten des ursprünglichen Eiweißzerfalles zu erhalten ist. Kostitschew und Brilliant versuchten die von mir beschriebene Erscheinung bei solchen Bedingungen zu erhalten, doch kamen sie zu negativen Resultaten.

In der Tabelle I zeigte ich, daß der Grad der Stickstofferhöhung nach Stutzer, ja sogar die Entdeckung dieser Erscheinung überhaupt, mit der Tiefe des Zerfalles eng verknüpft ist; in Versuchen mit der Lebedewschen Hefen war diese Erscheinung am besten dann zu beobachten, wenn der Zerfall des Eiweißes eben die Grenze von 50% überstiegen hat; je weiter der Zerfall fortgeschritten war, desto schwächer wurde die Anreicherung von Stickstoff nach Stutzer; in einem Falle, in dem der Zerfall 83% erreichte, wurde sogar darauf eine Erhöhung des Zerfalles bis 85% beobachtet. Unter den für die Wirkung der Peptase vorteilhaftesten Bedingungen konnte bei der Hefeautolyse eine nur unbedeutende Menge von Zwischenprodukten des Eiweißzerfalls erhalten werden, worauf auch Hahn und Geret[2]) hingewiesen haben, wird dagegen die Wirkung der Peptase erschwert, namentlich durch die sauere Reaktion und eine Temperatur von über 50° C, so geht unzweifelhaft eine Anreicherung von Zwischenprodukten vor sich.

[1]) S. Kostitschew und W. Brilliant, Bull. de l'Académie des Sciences de Russie 1916, S. 953.

[2]) E. Buchner, Die Zymasegärung, 1903.

Bei der Einführung saueren Phosphats in die Reaktion habe ich eine Erhöhung des Eiweißzerfalles und Anreicherung gewisser Zwischenverbindungen beobachtet, welche durch $Cu(OH)_2$ nicht gefällt wurden, doch in die mit essigsauren Blei oder Phosphorwolframsäure erzeugten Niederschläge übergingen; die Anreicherung dieser Zwischenverbindungen hatte fast gar keine Stickstofferhöhung nach van Slyke zur Folge, was auf ein großes Molekulargewicht der Zwischenverbindungen schließen läßt. Ich habe aus dem Niederschlage von essigsaurem Blei stickstoffhaltige Verbindungen ausgeschieden, und bin zu dem Schlusse gekommen, daß sich unter ihnen Zwischenprodukte des Eiweißzerfalles befinden; ob der Kupferniederschlag außer Albumosen und Peptonen auch andere krystallinische Produkte des Eiweißzerfalles enthält, ist eine andere Frage. Einige Beobachtungen sprechen für die Möglichkeit der Beimengung von Aminosäuren in diesen Niederschlägen. W. Zaleski und W. Schataloff[1]), welche ein Verfahren zur Bestimmung der Albumosen und Peptone im Filtrate vom $Cu(OH)_2$-Niederschlage vorgeschlagen haben, bezweifeln jetzt[2]) die Genauigkeit dieses Verfahrens, weil sie unter den aus dem Kupferniederschlage ausgeschiedenen Produkten die Anwesenheit von Aminosäuren entdeckt haben.

In der obenerwähnten Arbeit gaben auch Kostitschew und Brilliant zu, daß die Bestimmung des Stickstoffs der Albumosen und Peptone durch Fällung mit essigsaurem Blei im Filtrate vom Kupferniederschlag unzulässig ist. Die Verfasser meinen, daß die genannten Fällungsmittel zur fraktionierten Fällung von Eiweißstoffen und Peptonen nicht benutzt werden können. Meine früheren Bestimmungen der Albumosen und Peptone im Bleiniederschlage, nach der Fällung der Eiweißstoffe durch Kupfer, trugen stets einen vergleichenden Charakter; es war mir wichtig, festzustellen, daß die Mengen der Zwischenverbindungen des Eiweißzerfalles in Gegenwart von KH_2PO_4 größer waren als bei normalen Bedingungen, und daß die Mengen des durch Blei niedergeschlagenen Stickstoffs sich parallel verminderten; heutzutage kann ich nicht behaupten, daß die gesamte Menge Stickstoffs im Kupferniederschlage von Peptonen herrührt, doch bezweifle ich nicht, daß in diesem Niederschlage größtenteils Peptide enthalten sind.

In meiner ersten Arbeit[3]), in der ich den Zuwachs von Stickstoff nach Stutzer und die Verminderung von Stickstoff im Blei-

[1]) W. Zaleski und W. Schataloff, diese Zeitschr. **55**, 63. 1913.

[2]) W. Zaleski und W. Schataloff, Annalen der Universität Charkow, 1915.

[3]) N. N. Iwanoff, diese Zeitschr. **63**, 359. 1914.

niederschlage beobachtet habe, sprach ich die Vermutung aus, daß hier eine fermentative Synthese des Eiweißes aus Produkten des ursprünglichen Zerfalles stattfindet, und daß diese Synthese nur durch die Veränderung der sauren Reaktion in eine alkalische bedingt wird. Nach genauerem Studium dieser Erscheinung kann ich jetzt behaupten, daß unter gewissen Bedingungen eine Anreicherung von Stickstoff nach Stutzer zugunsten des Stickstoffs von Verbindungen peptiden Charakters stattfindet, und daß dieser Prozeß mit einer kaum merkbaren Bindung von Stickstoff nach van Slyke einhergeht.

Für die Eiweißnatur des von mir erhaltenen Stoffes spricht seine Fällbarkeit nach Stutzer und sein Ursprung aus den Produkten des ursprünglichen Eiweißzerfalles; eine unbedeutende Verminderung des Stickstoffs der Aminogruppen in diesem Prozeß weist auf eine bei dieser Erscheinung stattfindende Dehydratisation hin.

Meine Beobachtung über die Erhöhung des fällbaren Eiweißes unter dem Einfluß einer Veränderung der saueren Reaktion des Hefeautolysats in eine alkalische fanden kürzlich ihre Bestätigung in den Versuchen von K. Dernby (l. c.); dieser Verfasser führte in einem Falle die Zerspaltung des Peptons mit Hefeereptase aus; es stellte sich heraus, daß die zunächst klare Flüssigkeit auf Zusatz vom Alkali trübe wird und kleine Flocken ausscheidet. Der Verfasser stellte seine Beobachtungen mit den meinigen in Parallele und meinte, daß eine Erhöhung der Menge des ausgefällten Eiweißes noch keinen direkten Beweis für die Eiweißsynthese darstellt, durch Zusatz von Alkali verändert sich die Konzentration der H-Ionen in der Flüssigkeit, weshalb die kolloidalen amphoteren Elektrolyte ihren isoelektrischen Punkt erreichen und als Niederschlag ausfallen können. Dernby führte die Hefeautolyse aus und kam zum Schlusse, daß die Menge des Eiweißstoffes, der durch Fällung mit Zinnchlorid bestimmt wird, zu wachsen beginnt, während sich die Menge des peptiden Stickstoffs parallel vermindert. Die Konzentration der H-Ionen bleibt nicht konstant, sondern nimmt während dieser Reaktion stark ab (von $p_H = 6$ bis $p_H = 6{,}8$).

Die Veränderung der Konzentration der H-Ionen gibt eben, nach Verfassers Meinung, den Schlüssel zur Auffassung der Veränderungen der Mengen von Eiweiß- und von Peptonstickstoff

während der Autolyse. Diejenige Erhöhung der Konzentration der OH-Ionen, welche ich in meinen Versuchen durch den Zusatz von K_2HPO_4 erreichte, ereignete sich hier sukzessive und rief denselben Effekt hervor, den auch ich beobachtete. Die von mir ausgeführten Versuche erhielten also eine Bestätigung von Seiten K. Dernbys. Ob jedoch die Anreicherung von Stickstoff nach Stutzer auf eine fermentative Synthese des Eiweißes zurückzuführen ist, konnte bis jetzt noch nicht endgültig entschieden werden weil sich der Klärung dieser Frage große Schwierigkeiten entgegen stellten.

In einer Angabe von Herzfeld[1]) finden wir eine gewisse Andeutung der synthetischen Arbeit des proteolytischen Fermentes. Der genannte Verfasser untersuchte die Produkte des Eiweißzerfalles, welche er im Dialysat vermittels der Triketohydrinreaktion nachgewiesen hat; der Verf. hat mitgeteilt, daß man statt des Trypsinfermentes die Aminosäuren, speziell das Glykokoll, zur Hydrolyse des Eiweißes gebrauchen kann. Bei langdauernden Versuchen beobachtete der Verfasser zunächst eine Anreicherung des Stickstoffs der Aminosäuren, doch später — nach 500—1000 Stunden Hydrolyse — begann das Quantum dieses Stickstoffs sich zu verkleinern; in dieser letzten Erscheinung kann man ebenfalls eine Andeutung auf die Synthese erblicken.

Als ich auf den Gedanken kam, die Autolyse zu unterbrechen, die Reaktion in eine alkalische zu ändern und darauf die Autolyse bei einer höheren Temperatur bis zu 60° C fortzusetzen, habe ich eine bedeutende Bindung des Stickstoffes der Aminosäuren beobachtet, ohne eine parallele Anreicherung von Stickstoff nach Stutzer wahrzunehmen. Diese Bindung von Stickstoff nach van Slyke ereignete sich sogar in denjenigen Fällen, in welchen der Eiweißzerfall tiefere Stadien erreichte. Sie trat im letzten Falle noch deutlicher in Erscheinung, obgleich ein tiefer Eiweißzerfall eine zur Anreicherung von Stickstoff nach Stutzer unvorteilhafte Bedingung darstellt.

Des weiteren habe ich mir die Aufgabe gestellt, die Natur der Bindung der Aminogruppen aufzuklären. Bilden sich nämlich peptidartige Verbindungen aus Aminosäuren, so wird diese Erscheinung von der gleichzeitigen Bindung gleichvieler Amino- und Karboxylgruppen begleitet sein; sollte dabei der Beweis gelingen, daß dies ein fermentativer Prozeß ist, so hätten wir den Fall einer synthetischen Tätigkeit der Peptase.

---

[1]) Diese Zeitschr. **68**, 402. 1915.

Es wäre aber auch denkbar, daß die Verminderung der Aminogruppen einer Desaminierung der Aminosäuren zugeschrieben werden muß. In diesem Falle würde man das gebildete Ammoniak im van Slykeschen Apparate nicht bestimmen können, weil sich das Ammoniak während des 10 Minuten dauernden Kontaktes des Hefesaftes mit der salpetrigen Säure nicht unter Entwicklung von freiem Stickstoff zersetzt. Ich habe einen Versuch angestellt, in dem ich sowohl den Stickstoff nach van Slyke, als auch das Ammoniak bestimmte. Dabei soll darauf hingewiesen werden, daß sich die Autolyse stets in kleinen Kolben vollzog, welche mit Korkstöpseln dicht verschlossen waren. Ammoniakverluste kommen bei dieser Arbeitsweise nicht vor, wie Kontrollversuche gezeigt haben.

Im nachfolgenden und in einigen weiteren Versuchen habe ich Hefe zur Autolyse aufgestellt und nach Verlauf einer bestimmten Zeit die erhaltene klare Flüssigkeit abfiltriert. Im dritten Versuch wurde der nach der Hefeautolyse gewonnene Saft zunächst alkalisiert (bis 0,4%), ein Teil weiter autolysiert und der Rest zur Bestimmung von Ammoniak gebraucht; zu diesem Zweck wurde die Reaktion durch Schwefelsäure verändert, CaO zugesetzt und das Ammoniak unter vermindertem Druck von 10—15 mm und bei 40° C abgetrieben.

Versuch 3: 30 g trockener Hefe mit 200 ccm Wasser. Toluol. Die Autolyse dauerte 43 Stunden bei 42° C. Es wurden 120 ccm eines gelblichen Saftes abfiltriert, dazu 5 ccm 10proz. NaOH zugesetzt und davon Portionen je 10 ccm abgenommen.

	Stickstoff nach van Slyke in mg	NH_3-Stickstoff in mg
Kontrollportion 10 ccm Saft	51,7	3,8
desgl., doch weitere 24 Stunden Autolyse bei 60—63° C.	48,6	4,5

Aus dem Versuch ist ersichtlich, daß die Verminderung des Stickstoffs der Aminogruppen von 3,1 mg nur von einem winzigen Zuwachs des Ammoniakstickstoffs (4,5 — 3,8 = 0,7 mg) begleitet war. Sonach liegt hier der Schwerpunkt der Sache nicht in der Desaminierung der Aminosäuren.

Im vierten Versuch wurde im van Slykeschen Apparat Gas gesammelt — in den einen Portionen 10 Minuten lang, wie üblich, in den anderen 2 Stunden 10 Minuten. Im letzten Falle kam auch der gesamte Ammoniakstickstoff in Berechnung; selbstredend war infolge des langdauernden Einflusses der Säuren (salpe-

trige und Essigsäure) eine partielle Hydrolyse der Produkte des unvollständigen Eiweißzerfalles eingetreten.

Versuch 4: 20 g trockener Hefe mit 160 ccm Wasser. Toluol. Die Autolyse dauerte 66 Stunden bei 42° C. Es wurden 120 ccm Saft abfiltriert, zu dem 3 ccm 10 proz. NaOH zugesetzt wurden. Zu den Versuchen wurden je 10 ccm dieser Lösung verwendet.

	Stickstoff nach van Slyke in mg	
	in der Portion	im Vergleich mit d. Kontrollport.
1. Kontrollportion 10 ccm Saft	40,6	—
2. desgl. nach 24 Stunden bei 60° C. . .	37,9	−2,7
3. Kontrollportion 10 ccm Saft, Gas im Apparat während 2 Stunden 10 Min. gesammelt	47,7	—
4. desgl. doch weitere 24 Stunden bei 60° C. Gas ebenfalls während 2 Stunden 10 Min. gesammelt	45,3	−2,4

Es ist zu beachten, daß die Differenzen zwischen den Kontroll- und den Versuchsportionen fast gleich sind, gleichgültig, ob das Gas im Apparate 10 Minuten oder 2 Stunden 10 Minuten gesammelt wurde. Sonach ist die Verminderung von Stickstoff nach van Slyke kein Resultat einer etwaigen Desamination, da ja in der 3. und der 4. Portion sämtlicher Ammoniak berechnet wurde. Außerdem wurde diese Verminderung des Stickstoffs der Aminogruppen mit einer Synthese einer gewissen sehr beständigen Verbindung begleitet, welche sich auch bei dauerndem Einfluß von Säuren (2 St. 10 Min.) nicht zersetzt. Würde als Resultat der Synthese der Aminosäuren eine unbeständige peptidartige Verbindung entstehen, so hätte sie sich im van Slykeschen Apparat zersetzt, und wir würden keine Differenz zwischen den Portionen 3 und 4 erhalten; sonach muß man andere Wege einschlagen, um die beobachtete Erscheinung zu erklären.

Das Ausbleiben einer direkten Desamination bei Hefen in denjenigen Fällen, wo kein Zucker zugesetzt wurde, ist auch früher beobachtet worden. So kam Ehrlich[1]), der die Bildung von Bernsteinsäure aus Glutaminsäure bei der Gärung studierte, zu der Annahme, daß die Desamination in Abwesenheit von Zucker nicht stattfinde; auch bei der Vergärung von Zucker durch Zymin ist keine Desaminierung festzustellen. Leucin wurde nicht zersetzt. E. Buchner[2]) hatte in früheren Versuchen ebenfalls die Desamination im Hefesafte vermißt.

[1]) Diese Zeitschr. 18, 391. 1909.

[2]) Die Zymasegärung, 1903.

Nur die bereits desaminierten Aminosäuren können, wie C. Neuberg und Mitarbeiter für die Bildung von Amylalkohol und Bernsteinsäure dargetan haben, ohne Mitwirkung lebender Zellen jene Umwandlungen erfahren[1]).

Sonach erscheint die Verminderung des Quantums der Aminosäuren nicht als Resultat der Desamination. Die Literaturangaben verneinen unter den gegebenen Bedingungen die Wirkung der Desamidase überhaupt.

Darauf tauchte bei mir die Vermutung auf, daß die Aminosäuren vielleicht bei der hohen Temperatur meiner Versuche teilweise in die anhydride Laktamform übergingen; in diesem Falle konnte die Bindung der Amino- mit der Karboxylgruppe ebenfalls zur Verminderung von Stickstoff nach van Slyke führen. Wir wissen, daß die γ-Aminosäuren leicht Laktame geben.

In Anbetracht dessen, daß eine solche Verwandlung eine Verminderung des Stickstoffes der NH-Gruppe zur Folge haben, würde, drängte sich weiterhin die Frage auf, ob nicht in meinen früheren Versuchen die Glutaminsäure eine ähnliche Rolle spielte; wie Schenk[2]) zeigte, bildet sich diese letztere bei der Hefeautolyse. Wir besitzen auch Angaben[3]), daß die Salze der Glutaminsäure bei einer Erhitzung bis 180° C unter Wasserverlust in Salze der Pyrrolidoncarbonsäure übergehen, welche sich durch Säuren und Alkalien wieder in die Glutaminsäure verwandelt.

An Hand der Angaben Abderhaldens habe ich aus 70 g trockenen Kleber[4]) 10 g des Chlorhydrats der Glutaminsäure dargestellt, das ich für weitere Versuche benutzte. Doch haben meine sämtlichen Versuche, durch Zusatz der Glutaminsäure eine größere Bindung der Aminosäuren zu bewirken, zu keinen greifbaren Resultaten geführt. Dieser Umstand zwingt von der Vermutung abzusehen, daß die Verminderung des Stickstoffs NH-Gruppe mit der Verwandlung von Aminosäuren, namentlich der Glutaminsäure, in ihre Anhydridform verknüpft ist.

In der medizinischen Literatur[5]) sind Angaben vorhanden, daß sich die Oxysäuren und die Aminosäuren fest mit Harnstoff

---

[1]) C. Neuberg und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **52**, 494; **59**, 188. 1913; **67**, 32. 1914; **71**, 226. 1915; **91**, 131. 1918.

[2]) M. Schenk, Wochenschr. f. Brauerei **22**, 221. 1905.

[3]) E. Abderhalden und Kautzsch, Zeitschr. f. phys. Chem. **64**, 447; **68**, 487. 1910.

[4]) Aus diesem Kleber wurde durch Bearbeitung mit Alkohol das Glyodin entfernt, welches zu weiteren Versuchen diente.

[5]) E. Salkowski, Zeitschr. f. phys. Chem. **4**, 55. 1880.

verbinden und dabei Uramidosäuren geben; diese letzteren gehen leicht in die Laktamform über. Da bei dem Eiweißzerfalle stets Arginin erhalten wird, welches bei weiterer fermentativen Zerspaltung Ornithin und Harnstoff gibt, lag die Vermutung nahe, daß die Verminderung der Aminogruppen durch ihre Bindung mit Harnstoff in alkalischer Lösung erklärt werden kann. In diesem Falle müßte ein Zusatz von Harnstoff zu dem Autolysat eine merkbare Verminderung der Aminogruppen hervorrufen. Haben Versuche auch gezeigt, daß die Bindung von Stickstoff nach van Slyke in Gegenwart von Harnstoff energischer vor sich geht, so wurde doch kein großer Effekt beobachtet; sonach ist auch diese Vermutung gefallen.

Wenn in meinen Versuchen eine Verwandlung der Aminosäuren in peptide Verbindungen vor sich geht, so muß deren Verminderung nicht nur mittels der Stickstoffbestimmung nach van Slyke zu beobachten sein, sondern auch mittels der Sörensenschen Methode, wobei man die Menge des NH_2-Stickstoffes in der gegebenen Portion aus dem Quantum der Carboxylgruppen zu berechnen gestattet. Die Arbeit mit Hefesaft gab mir auch die Möglichkeit, die Mengen von Carboxylgruppen genau zu berechnen. In sämtlichen Fällen, in denen die Reaktion der Portionen alkalisch war, wurde sie selbstredend vor der Titrierung nach Sörensen neutralisiert.

Versuch 5: 25 g trockener Hefe mit 200 ccm Wasser. Toluol. Die Autolyse dauerte 44 Stunden bei 46—40° C. Es wurden 140 ccm Saft abfiltriert. Davon wurden a) je 10 ccm zur Bestimmung des Stickstoffs der NH_2-Gruppen und b) je 20 ccm zur Titrierung nach der formellen Methode abgenommen. Zum Vergleich ist der Stickstoff der Aminogruppen auf eine 20 ccm fassende Portion umgerechnet werden.

	Stickstoffmenge nach van Slyke in mg	Menge des zur Neutralisation der Carboxylgruppen nötigen $^n/_5$-$Ba(OH)_2$ in ccm
1. Kontrollportion, 20 ccm Saft + 1 ccm 10 proz. NaOH . .	77,2	33,9
2. desgl. doch weitere 24 Stunden Autolyse bei 60° C	70,2	34,0

7,0 mg des Stickstoffes der Aminogruppen haben sich verbunden, während die Menge der Carboxylgruppen unverändert blieb. Von einer Synthese aus Aminosäuren kann also nicht die Rede sein. Denn es ist unmöglich, sich eine Bildung von

Polypeptiden vorzustellen, ohne daß gleichzeitig mit den Aminogruppen auch ein gleichgroßer Betrag von Carboxylgruppen verschwindet. Es bleibt noch die Frage aufzuklären, ob die Bindung des Stickstoffs nach van Slyke einen fermentativen Prozeß vorstellt. In diesem Zwecke habe ich die Versuchstemperatur auf 75—80°, ja sogar bis zum Siedepunkt des Autolysats gesteigert, mit dem Ergebnis, daß der Bindungsprozeß der Aminosäuren dadurch nicht zum Stillstand gebracht werden konnte. Es kann also nicht als fermentativer Prozeß angesprochen werden.

Zur Erklärung dieses Phänomens mußte also eine ganz andere Richtung eingeschlagen werden. Einen Fingerzeig boten einige frühere Versuche, in denen bei Gegenwart von Glucose eine große Bindung von NH_2-Stickstoff beobachtet worden war. Dieser Umstand brachte mich auf den Gedanken, daß das Verschwinden der Aminogruppen durch eine Kuppelung der Aminosäuren mit Zucker zustande kommt, da sich ja Glykose fast stets nach Beendigung der Autolyse in den Portionen befindet.

Bevor ich zur Schilderung meiner diesbezüglichen Versuche übergehe, will ich von den Resultaten einer zweiten Arbeit von Kostitschew und Brilliant (l. c.) berichten, welche gleichzeitig mit meiner Arbeit erschienen ist und der ich die soeben beschriebenen Versuche entnommen habe. Neue Angaben der erwähnten Verfasser beziehen sich auf das Studium der Anreicherung stickstoffhaltiger Verbindungen nach Stutzer im autolysierten Safte, wenn ihm eine bedeutende Menge Glykose zugesetzt wird und er darauf mit einem Antisepticum noch einige Tage im Thermostaten stehen bleibt. Es stellte sich heraus, daß die nach dem Stehen mit Zucker synthetisch gebildeten stickstoffhaltigen Verbindungen durch Kupferhydroxyd, jedoch nicht durch essigsaures Blei gefällt wurden; die Verfasser kommen zu dem Schlusse, daß der Zucker für die Synthese nicht nur deshalb notwendig ist, weil er die Proteolyse verhindert, sondern auch deshalb, weil er an der Synthese teilnimmt; besonders merkwürdig erschien die Beobachtung, daß Prozesse, welche zur Bildung der nach Stutzer gefällten Verbindungen führen, auch in dem Falle eintraten, wenn die autolysierte Hefe zum Sieden erhitzt worden war; in diesem Falle war sogar die Menge der synthetisch gebildeten Produkte noch größer. Zu guter Letzt erwies sich, daß die Synthese auch ohne Hefe vor sich geht; so wurden z. B. 4 g Glykose + 0,4 g kohlensaures Ammonium + 0,5 g Glykokoll mit 10 ccm Wasser während 3 Tagen bei 55° C ohne Hefe stehen gelassen und wurden im Resultat 42,0 mg stickstoffhaltiger Verbindungen gefunden, die sich nach Stutzer niederschlagen ließen. Sonach reagieren nach Meinung der Verfasser die Aminosäuren mit Zucker ohne Einfluß von Fermenten. In diesem Punkte sind die Verfasser der von Maillard erhobenen Frage nahegetreten, welcher die Entstehung komplizierter stickstoffhaltiger

Verbindungen bei der Einwirkung von Aminosäuren auf Glycerin oder auf Zucker beobachtet hatte, wenn ihre hochkonzentrierten Lösungen auf dem Wasserbade erwärmt wurden. Die Arbeiten von Maillard sind in einer umfangreichen Monographie[1]) zusammengestellt, welche uns leider noch nicht erreichte und nur aus Referaten bekannt ist; einzelne Versuche sind jedoch in zahlreichen Artikeln in den Comptes rendus beschrieben. Maillards Synthesen sind von besonderem Interesse für den Physiologen, weil die Bedingungen, unter denen sie stattfinden, zu denjenigen in enger Beziehung stehen, welche bei der Funktion der lebenden Zelle beobachtet werden.

Des weiteren wandte sich Maillard[1]) dem Studium der Synthesen von Zuckerarten mit den Aminosäuren zu. Diese Synthesen verlaufen nach seinem Bericht heftig bei 150° C, ziemlich rasch bei 100° C, doch wird die Reaktion auch bei 37° C und sogar bei noch niedrigerer Temperatur nach Verlauf einiger Tage beobachtet. Bei der gegenseitigen Wirkung von Zuckerarten und Aminosäuren wird eine amorphe, schwarze, huminartige Substanz erhalten; bei ihrer Synthese spaltet die Aminosäure CO_2 ab, während die Aminogruppe mit der Aldehyd- oder der Ketongruppe unter Wasserverlust reagiert.

Maillards Arbeiten sind von großer Bedeutung für die Aufklärung vieler Prozesse, die sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Zucker und Aminosäuren abspielen; bei der Hydrolyse der Organe und Gewebe z. B., kann ein Teil der aus Eiweißstoffen entstandener Aminosäuren mit Zucker unter Bildung huminartiger Verbindungen reagieren und auf diese Weise der Bestimmung entschlüpfen. Nach den Arbeiten des Verfassers wird die Bildung bald großer, bald kleinerer Mengen huminöser und melanoidinartiger Stoffe bei der Hydrolyse verschiedener Eiweißstoffe verständlich; so ist z. B. bekannt, daß Hystone, in deren Zusammensetzung die Kohlenhydratgruppe nicht vorhanden ist, beim Sieden mit einer 25—30proz. Schwefelsäure gar keine huminösen Stoffe geben. Im allgemeinen haben Maillards Arbeiten einen neuen Faktor in die Technik der Analyse von Gemischen hereingebracht, in welchen gleichzeitig Zucker und Aminosäuren vorhanden sind; die Möglichkeit ihrer gegenseitigen Wirkung muß auch beim Studium der Gärung in Rechnung gezogen werden, worüber ich später berichten werde.

Diese Studien erlauben diejenigen vereinzelten Tatsachen zu verallgemeinern, welche in der Hefeliteratur beschrieben und bis heute keine Erklärung erhalten haben. Ich werde einige derselben erwähnen und ausführlicher die aus dem Laboratorium von B. Robertson hervorgegangene Arbeit von Birckner[2]) anführen.

Birckner arbeitete mit kalifornischen Hefen des sog. Dampfbieres („steam beer"); diese Hefe unterscheidet sich von den anderen durch einige physiologische Eigenschaften; als der Verfasser z. B. einen Extrakt aus derselben zu einer konzentrierten Glykoselösung hinzusetzte und dabei

[1]) Maillard, Paris 1913; Cpt. rend. **154**, 66. 1912.

[2]) Birckner, V., Journ. of the Americ. chem. soc. **34**, 1213. 1912.

nach Croft-Hill und Emmerling eine Synthese der Maltose erwartete, so erwies sich, daß das erwartete Disaccharid nicht entstanden war. Nachdem dieses Gemisch im Thermostat bei 70° C 24 Stunden stehengeblieben war, hatte es eine rötlichbraune Färbung angenommen; nach Verlauf weiterer 2—3 Tage wurde die Farbe dunkelrot und der Geruch aromatisch; Nach dauerndem Stehen in einem dicht verschlossenen Probiergläschen bei 70° C wurde die Flüssigkeit ganz schwarz und hatte eine braune körnige Substanz ausgeschieden. Der Inhalt des Kolbens reagierte gegen Lackmus sauer und schied während der ganzen Dauer des Stehens im Thermostat kein Gas aus; bei 30° C und bei der langen Dauer des Versuches wurden keine Veränderungen beobachtet, die Lösung behielt immerwährend ihre sauere Reaktion und gelbliche Färbung. Mit Kontrollversuchen überzeugte sich der Verfasser, daß weder Zucker noch Hefeextrakt allein unter den oben bezeichneten Bedingungen eine solche Färbung geben und vermutete daher, daß mit dem Hefeextrakt ein gewisser katalytischer Faktor hereingetragen worden war, welcher die beschriebene Erscheinung hervorgerufen hatte. Dieser eigentümliche Faktor, den der Verfasser als Glucoseferment bezeichnet, wird sogar in der Siedehitze nicht zerstört („boiling does not destroy its activity"); im letzten Fall wird sogar eine bessere Färbung erhalten. Beim trocknen Erhitzen des dunklen Stoffes hat der Verfasser einen Karamelgeruch wahrgenommen, den auch Maillard beobachtet hat. Unter den Produkten des Glykosezerfalles fand Birckner Pentosen und Formaldehyd, jedoch weder CO_2 noch Alkohol. Er kam so zu dem Schlusse, daß sich unter dem Einflusse des Fermentes „Glucase" der Zerfall der Glykose nicht auf dieselbe Weise vollzieht wie unter dem Einflusse der Zymase.

Heutzutage darf man ohne Zweifel sagen, daß Birckner gar keine „Glucase" in Händen hatte und daß er mit dem Hefeextrakt zur Glykose nicht ein eigentümliches Ferment, sondern stickstoffhaltige Produkte hinzusetzte, am wahrscheinlichsten Aminosäuren, welche als Material zur Synthese mit der Glykose dienten; die Konzentrationen waren in den Versuchen des Verfassers bedeutend; so nahm er z. B. 160 ccm einer 40 proz. Glykose mit 40 ccm Hefeextrakt. Birckner hat den in seinen Versuchen erhaltenen schwarzen Niederschlag nicht untersucht, derselbe soll wahrscheinlich mit Maillards huminösen Substanzen identifiziert werden; diese Vermutung besitzt große Wahrscheinlichkeit, weil der Verfasser für seine Synthesen eine hohe Temperatur und hohe Glykosekonzentrationen benutzt hat, dies sind nämlich die zum Verlauf dieses Prozesses vorteilhaftesten Bedingungen; in dem vom Verfasser zugesetzten Hefeauszuge waren zweifellos Eiweißzerfallprodukte enthalten, welche den zweiten Bestandteil der huminösen Stoffe bilden. Sonach muß Birckners Arbeit als eine Bestätigung der Angaben der obenerwähnten Verfasser angesehen werden. Die Versuche von Rubner[1]) über Synthesen aus Produkten der Hefeautolyse zählen wahrscheinlich auch zur Klasse der Erscheinungen,

[1]) M. Rubner, Die Ernährungsphysiologie der Hefezelle bei alkoholischer Gärung. Leipzig 1913.

welche von Kostitschew und W. Brilliant beschrieben sind. Rubner autolysierte 5 g Hefe mit Toluol bei 30° C während 3 Tagen; die erste Portion (Kontrollportion) hat er analysiert, zu einer zweiten ebensolchen Portion (Versuchsportion) setzte er bis 10% Zucker hinzu und ließ sie weitere 24 Stunden im Thermostat; darauf unterwarf er sie ebensolchen Bestimmungen wie die Kontrollportion. Rubner bestimmte den Stickstoff in Hefen nach deren Abzentrifugierung und in der Flüssigkeit; außerdem wurde im Zentrifugat Stickstoff im Niederschlage der Phosphorwolframsäure und als NH_2-Stickstoff bestimmt.

	N-Menge in der Kontrollportion in mg	N-Menge in der Versuchsportion in mg
In Hefen	105,6	123,2
in der Flüssigkeit	23,1	6,3
im Niederschlage der Phosphorwolframsäure	18,6	0
NH_2-Stickstoff	3,5	0

Der Verfasser zieht den Schluß, daß die Synthese aus stickstoffhaltigen Produkten in Gegenwart von Zucker auch unabhängig von dem Lebensprozeß stattfindet.

Sämtliche Verfasser, die ähnliche Synthesen erhalten haben, behaupten in voller Übereinstimmung, daß bedeutende Zuckerkonzentrationen notwendig sind, damit der Bindungsprozeß der Aminosäuren glatt gehe. Maillard nahm 3—4 Teile Wasser auf 4 Teile Glykose, bei Kostitschew und Brilliant erreichte die Konzentration 40%, bei Birckner 32%, doch ist die Frage, ob Synthesen bei schwachen Glykosekonzentrationen möglich sind, ungelöst geblieben.

Ich lasse nun meine oben angekündigten Versuche folgen. Die Verminderuug des Stickstoffs nach van Slyke war verhältnismäßig sehr gering, fand jedoch ohne Zusatz von Zucker statt. Als ich diejenigen Portionen, in welchen die Synthese von Glukose mit Aminosäuren zu erwarten war, auf ihr Verhalten gegen Fehling untersuchte, erhielt ich stets ein positives Resultat.

Während des Autolyse, und zwar nach Inaktivierung der Zymase fand Hydratisation der Polysaccharide unter Anreicherung reduzierenden Zuckers statt; die Menge dieses Zuckers verminderte sich bedeutend, wie ich es in denjenigen Versuchsportionen beobachtete, in welchen die Bindung der Aminosäuren stattgefunden hatte, in einigen Fällen verschwand sogar der Zucker vollständig.

Um die oben ausgesprochene Annahme noch besser zu stützen, wäre noch zu zeigen, daß ein Zusatz geringer Mengen von Zucker zu den autolysierten Portionen eine entsprechende Bindung von Stickstoff nach van Slyke hervorzurufen vermag.

Versuch 6: 6 Portionen Lebedewscher Hefe zu ca. 1,1 g mit 10 ccm Wasser. Toluol. Die Autolyse dauerte 88 Stunden bei 34° C. Das Quantum von Eiweißstickstoff variierte von 91,2 bis 94 mg pro Portion; die Resultate sind auf eine 100 mg Stickstoff enthaltende Portion umgerechnet worden.

	Stickstoff nach van Slyke in mg	Stickstoff in mg gebunden
1. Autolyse 88 Stunden	58,5	—
2. desgl. doch 0,5 ccm 10 proz. NaOH zugesetzt und weitere 24 Stunden bei 58° C autolysiert.	56,9	1,6
3. desgl. doch vor der weiteren 24stündigen Autolyse noch 0,1 g Glykose zugesetzt	56,0	2,5
4. desgl. doch 0,4 g Glykose	54,2	4,3
5. „ „ 1,6 „ „	41,1	17,4
6. „ „ 6,4 „ „	34,0	24,5

Weitere zwei Portionen wurden — der ersten und der zweiten parallel — angesetzt. In beiden ist die Anwesenheit von Zucker nachdem die Eiweißstoffe durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen waren, durch ihr Verhalten gegen Fehling festgestellt worden, doch war die reduzierende Kraft in der zweiten Portion bei weitem schwächer, als in der ersten. Als besonders wichtig ist in diesem Versuch zu unterstreichen, daß ein Zusatz so kleiner Mengen Zucker, wie 0,1 resp. 0,4 g, schon die Bindung von immer größeren Mengen des Stickstoffs der Aminosäuren bewirkte.

Wenn die Einführung von 0,1 resp. 0,4 g Glykose (was 1% resp. 0,4% entspricht) in die Reaktion ein positives Resultat zeitigt, so ist es klar, daß diejenige winzige Bindung der Aminosäuren, welche in der zweiten Portion ohne Zusatz von Zucker beobachtet wurde, durch die Anwesenheit des Zuckers erklärt werden darf, der durch Hydrolyse der Polysaccharide während der Autolyse entsteht. Im letzten Fall ist die Zuckermenge unbedeutend; darüber kann nach der Geringfügigkeit der Stickstoffbindung nach van Slyke in der zweiten Portion geurteilt werden. Meine Versuche, den Zucker quantitativ nach Bertrand zu bestimmen, namentlich in Portionen, die der ersten und der zweiten Portion parallel angesetzt wurden, d. h. vor und nach der Synthese der Aminosäuren, haben keine klaren Resultate ergeben; versucht man den Zucker in Portionen zu bestimmen, welche von Eiweißstoffen durch Fällungsmittel wie Kupferhydroxyd oder essigsaures Blei befreit worden sind, so fällt ein voluminöser Nieder-

schlag aus, der die Zuckerbestimmung hindert. Im nächsten Versuch dagegen verschwand der Zucker vollständig.

Versuch 7: 10 Portionen Levurine zu je ca. 1,1 g mit 10 ccm Wasser. Toluol. Die Autolyse dauerte 41 Stunden bei 40° C. Sämtliche Berechnungen wurden auf eine 100 mg Eiweißstickstoff enthaltende Portion gemacht; in einzelnen Portionen variierte diese Menge von 91,1 bis 94,9 mg.

		Stickstoff nach van Slyke in mg		Im Vergleich mit der Kontrollportion hat sich gebunden
1.	Autolyse 41 Stunden bei 40° C .	52,1	52,3	0
2.	desgl.	52,6		
3.	desgl., doch darauf 0,8 ccm 4 proz. NaOH zugesetzt und	50,8	50,9	1,4
4.	weitere 44 Stunden bei 56—60° C autolysiert	51,0		
5.	desgl., wie 3 und 4, doch vor den 44 Stunden Autolyse	49,5	49,3	3,0
6.	0,2 g Glykose zugesetzt	49,1		
7.	desgl. wie 5 und 6, doch	47,3	47,2	5,1
8.	0,4 g Glykose	47,2		
9.	desgl., 0,3 g Glykogen zugesetzt .	47,9	47,8	4,5
10.	desgl.	47,7		

In der 1. und 2. Portion wurde nach 41 Stunden Autolyse eine gute Reaktion auf Zucker erhalten; doch führte in der 3. und 4. Portion, welche während 44 Stunden bei 56—60° C mit Alkali behandelt worden waren, die Fehlingsche Probe zu negativen Resultaten; hier hat sich der gesamte Zucker mit Aminosäuren verbunden. Interessant ist, daß der Zusatz auch winziger Mengen Glykogens die Bindung der NH_2-Gruppe erhöht; offenbar findet hier eine Verzuckerung des Glykogen statt, und darauf schon die Bindung seiner Umwandlungsprodukte mit den Aminosäuren.

Ich habe noch den Versuch einer langdauernden gegenseitigen Wirkung von Glykose und Leucin ohne Hefe angestellt, wobei ich keine so bedeutenden Konzentrationen benutzte, als die früher zitierten Autoren.

Versuch 8: Eine Lösung von 1,6 g Leucin in 80 ccm erwärmten Wassers und in 4 Portionen zu je 20 ccm geteilt und zu jeder Portion je 3 g Galaktose zugesetzt; sonach war eine 2 proz. Leucin- und 15 proz. Galaktoselösung vorhanden. Die Stickstoffmengen wurden nach van Slyke in Milligramm bestimmt. Die 2., 3. und 4. Portion sind im Thermostaten bei 40° C mit Toluol aufbewahrt worden.

1. Kontrollportion 20 ccm . . . . . 42,7 mg
2. desgl., 7 Tage bei 40° C . . . . . 41,5 „
3. desgl., 3 Monate . . . . . 33,4 „
4. bei 40° C . . . . . 33,6 „

Nach Verlauf von 7 Tagen ist die 2. Portion etwas gelblich geworden. Es haben sich also nur Spuren der huminösen Substanz gebildet. Nachdem jedoch die Flüssigkeit 3 Monate im Thermostat geblieben war, hatte dieser Prozeß gute Fortschritte gemacht, die Flüssigkeit war braun geworden und auf dem Boden des Kölbchens hatte sich ein geringer Niederschlag der huminösen Substanz abgesetzt. Die Menge des gebundenen Stickstoffs fand ich zu 9,2 mg (42,7—33,5). Im 3. und 4. Kölbchen hatten sich Glasbläschen ausgeschieden, was nach Maillards Angaben zu erwarten war. Der Inhalt der Kölbchen erwies sich völlig steril. Wenn die Bindung der Aminosäuren bei der Thermostattemperatur stattfindet und sogar keine großen Glykosekonzentrationen erfordert, so muß unzweifelhaft diese Erscheinung in all den Fallen in Rechnung gezogen werden, bei welchen in den Versuchen Zucker und stickstoffhaltige Produkte gleichzeitig zugegen sind, z. B. bei der Zuckergärung; ich werde auf diese Frage später zurückkommen, möchte jedoch hier noch bemerken, daß die Anwesenheit sogar getöteter Hefe die Bindung der Aminosäuren mit Zucker befördert, wahrscheinlich haben wir es in diesem Fall mit Absorptionserscheinungen zu tun.

Versuch 9: Portionen trockener Hefe zu je 1 g mit 10 ccm Wasser sind auf dem Wasserbade während 2 Minuten zum Sieden erhitzt worden; zu sämtlichen ist zugesetzt worden: 1. Je 2 ccm Glykokollösung mit 0,2 g trockener Substanz; 2. je 1,8 g Glykose; 3. Toluol und 3 Tropfen 10 proz. NaOH; zur Kontrolle wurden alle diese Substanzen auch zu 10 ccm Wasser zugesetzt. Die Portionen blieben im Thermostat bei 40° C stehen; nach Verlauf einer bestimmten Zeit wurden die Portionen zur Stickstoffbestimmung nach van Slyke gebraucht.

Dauer des Aufenthalts im Thermostat	Stickstoff nach van Slyke in mg	
	Kontr. 10 ccm Wasser, Glykokoll, Glykose	Glykokoll, Glykose und 1 g getöteter Hefe
0	35,7	42,7
2 Tage	—	38,2
4 „	—	36,1
6 „	33 5	35,1

Während 6 Tagen ist im System Glykokoll-Glykose 2,2 mg Stickstoff gebunden (35,7—33,5), in Gegenwart gesottener Hefe — 7,6 mg (47,7—35,7). In diesem Falle hatte Hefe eine größere

Stickstoffbindung nur durch ihre Gegenwart befördert, denn die Fermente waren durch das Erhitzen getötet, und dasjenige winzige Quantum NH_2-Stickstoffs, welches in ihnen enthalten war, vermochte keine Zuckerbindung hervorzurufen, wie Kontrollversuche zeigten. Ich will noch einen Versuch anführen, in dem eine Bindung des NH_2-Stickstoffs bei 15 proz. Glykosekonzentration beobachtet wurde; die Synthese fand im System Wasser, Glykokoll, Glykose statt.

Versuch 10: 0,2 g Glykokoll wurden in 20 ccm Wasser gelöst und davon Portionen zu je 10 ccm abgenommen; zu jeder derselben wurde 1,5 g Glykose und darauf Toluol zugesetzt; die Kontrollportion wurde sofort analysiert, die Versuchsportion blieb im Thermostat bei 44—50° C 7 Tage lang stehen, wobei eine deutliche Bräunung auftrat. Die Stickstoffanalyse nach van Slyke ergab:

Kontrollportion	15,9 mg
Versuchsportion	13,9 „

Nach Maillard findet bei der Bildung huminöser Substanzen die Zersetzung der Karboxylgruppe der Aminosäure statt, sonach mußte auch in meinen Versuchen, in denen ja der Verlauf des gleichen Prozesses vorausgesetzt wird, parallel mit der Bindung der Aminogruppen eine gleich starke Bindung der Karboxylgruppen nachzuweisen sein; dagegen folgt aus dem fünften Versuch einwandfrei, daß ein solcher Parallelismus nicht vorhanden ist. Wie ist diese mangelnde Übereinstimmung zu erklären? Die Ursache ist darin zu suchen, daß die Bezeichnung „huminöse Substanz" ein Sammelname für eine ganze Reihe von Verbindungen der Aminosäuren mit Zucker ist. Bei der Wiederholung der Synthesen von Maillard habe ich öfters bemerken können, daß der Prozeß der Bräunung des Gemisches rasch eintritt, doch die Entwicklung von CO_2 erst nach Verlauf einer längeren Zeit beginnt; es existiert offenbar eine ganze Reihe von Zwischenreaktionen, wobei sich zunächst die Aminogruppe bindet, und erst im nächsten Stadium die Abspaltung der CO_2 stattfindet. Die schwarze geleeartige Masse wird zu allerletzt, am Ende der Synthese erhalten; während der ersten Zeit bleiben die huminösen Stoffe in Lösung.

In meinen sämtlichen Versuchen, in denen sich die Bindung der Aminosäuren mit Glykose ohne Hefe in verdünnten Lösungen vollzog, habe ich keine Ausscheidung von Kohlensäure beobachtet; Nur ein Fall (8. Versuch), in welchem die Synthese 3 Monate dauerte, machte eine Ausnahme; dagegen findet die Bräunung

der Lösungen und die Bindung der Aminogruppen stets statt. Verlief die Synthese in verdünnten Glykoselösungen und bei verhältnismäßig großen Mengen NH_2-Stickstoffs, welche am Ende der Hefeautolyse beobachtet wurden, so endete diese Synthese bereits im ersten Stadium dieses Prozesses, bei welcher die Aminogruppe bereits gebunden ist, die Karboxylgruppe sich aber noch nicht unter Ausscheidung von Kohlensäure zersetzt hat. Die Bräunung der Lösung, welche als äußeres Merkmal so charakteristisch für Maillards Synthesen ist, wurde in meinen Versuchen stets beobachtet, als die autolysierten Hefeportionen nach Zusatz einer kleinen Menge Alkali weiter bei 58—60° C aufbewahrt wurden; diese Erscheinung wurde sowohl bei Zusatz von Zucker, als auch ohne ihn beobachtet. Wurden jedoch die autolysierten Hefeportionen unter Innehaltung der anderen Bedingungen bei Zimmertemperatur gelassen und nach Verlauf von 20—24 Stunden nach van Slyke untersucht, so wurde keine Bindung beobachtet.

Bei Bindungsprozessen ähnlicher Art erweist sich die Methode van Slykes als äußerst empfindlich und erlaubt auch eine recht kleine Verminderung des NH_2-Stickstoffs nachzuweisen, was in denjenigen Fällen besonders wichtig ist, in welchen man diese Reaktion in verdünnten Lösungen zu beobachten hat.

Kostitschew und Brilliant, welche die Synthesen stickstoffhaltiger Stoffe in Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen (40% und mehr) und bei hoher Temperatur anführen, haben Substanzen erhalten, welche durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen werden; parallel beobachteten sie die Verminderung des Stickstoffs der Aminogruppen, wobei sich der Zuwachs von Stickstoff im Niederschlage nach Stutzer mit der Verminderung des Stickstoffs der Aminogruppen beinahe deckte. Eine große Zuckerkonzentration beförderte in den Versuchen der Verfasser die Bildung beständigerer Verbindungen, offenbar huminöser Art, welche beinahe gänzlich nach Stutzer niedergeschlagen wurden; dagegen sind meine Beobachtungen der Bindung der Aminogruppen ohne fremden Zuckerzusatz nicht von einer Stickstoffanreicherung im Kupferhydroxydniederschlage begleitet worden. Der Grund ist, daß Produkte, welche ich erhalten habe, noch den Charakter von Zwischenprodukten trugen und nach Stutzer nicht niedergeschlagen wurden, obzwar ihr Stickstoff sich im van Slykeschen Apparate bereits dem Nachweis entzogen hatte.

Schlußfolgerungen.

1. Erreicht der Eiweißzerfall bei der Hefeautolyse eine bestimmte Grenze, so kann man nach der Alkalisierung der Lösung, und fortgesetzter Autolyse eine Anreicherung von Eiweißstickstoff beobachten, der sich nach Stutzer bestimmen läßt.

2. Diese Stickstoffanreicherung findet zugunsten der Fraktion der ursprünglichen Eiweißzerfallsprodukte statt, welche durch Phosphorwolframsäure und durch essigsaures Blei niedergeschlagen werden; sie wird von einer nur unbedeutenden Stickstoffbindung nach van-Slyke begleitet.

3. Nach einer bedeutenden Arbeit der Peptase während der Hefeautolyse bei hoher Temperatur und bei Herstellung einer alkalischen Lösung wird eine Stickstoffverminderung nach van Slyke beobachtet, die keine Stickstoffanreicherung nach Stutzer zur Folge hat.

4. Die Verminderung der Aminogruppen unter diesen Bedingungen ist kein Resultat einer etwaigen Desamination und ist nicht von einer Verminderung der Karboxylgruppen begleitet; sie führt zur Bildung einer äußerst beständigen Verbindung.

5. Die Bindung der Aminogruppen erklärt sich durch eine Bildung von Verbindungen huminöser Art auf Kosten der Aminosäuren des Autolysats und derjenigen kleinen Zuckermengen, die nach der Autolyse übrig geblieben sind.

6. Vorangehender Grundsatz stützt sich auf die Beobachtung, daß die Bindung der Aminosäuren mit Zucker (Synthesen nach Maillard) sich auch bei schwachen Konzentrationen der genannten Stoffe vollzieht.

Über Eiweißspaltung in Hefen während der Gärung.

Von

Nicolaus N. Iwanoff.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Petersburg.)

(Eingegangen am 23. April 1921.)

Im Stickstoffhaushalt der Tiere dient ein Teil des assimilierten Eiweißes als Ersatz des verbrauchten stickstoffhaltigen Materials der Zellen. Der tierische Organismus verliert stets ein gewisses Quantum von Stickstoff; wir können diesen Verlust bis auf ein Minimum herunterschrauben, sind jedoch nicht imstande, ihn auf Null zu bringen, sogar in dem Falle, wo wir den Zufluß der stickstoffhaltigen Nahrung vollständig ausschalten. Dieser unvermeidliche Verlust von Eiweiß wird von Rubner[1]) als Abnutzungsquote bezeichnet.

Andererseits wissen wir, daß die Pflanze den assimilierten Stickstoff sehr sorgsam behandelt, daß sie stickstoffhaltige Abfallstoffe nicht ausscheidet; entstehen Produkte des Eiweißzerfalls, so kehren sie wieder in den Umsatz zurück. Nur einzelne Fälle stellen eine Ausnahme von dieser Regel dar; es ist uns zum Beispiel die Arbeit der denitrifizierenden Bakterien bekannt, welche in ungeheueren Mengen den von anderen Organismen aufgesammelten Stickstoff zersetzen; ferner vermögen bei gewissen Versuchsbedingungen Wasserpflanzen molekularen Stickstoff auszuscheiden usw.[2]) Im allgemeinen werden jedoch die Tier- und Pflanzenwelt in bezug auf die Ausnutzung stickstoffhaltiger Nahrung einander entgegengestellt. Dieser charakteristische Unterschied der beiden Naturreiche bleibt auch in dem Falle in Kraft, wo wir zu Schmarotzer- und saprophytischen Pflanzen übergehen, welche

[1]) Die Ernährungsphysiologie der Hefezelle bei alkoholischer Gärung. Leipzig 1913.

[2]) A. Irving und R. Hankinson, Biochemical Journ. **3**, 87. 1908.

fertige Eiweißstoffe oder deren Zersetzungsprodukte benutzen. Die sich in diesen Pflanzen befindenden proteolytischen Fermente zerstören das ihnen fremde Eiweiß und bilden arteigene Eiweißstoffe aus den Zersetzungsprodukten ihres Wirtes. In einigen Fällen, wie zum Beispiel während der Hefekultur bei reichlicher Zugabe stickstoffhaltiger Substanz, scheint jedoch die Hefe nicht imstande zu sein, den Stickstoff so ökonomisch auszunutzen, wie die autotrophe Pflanze, welche auch minimale Mengen des gebundenen Stickstoffes spart.

A. Mayer[1]) hat sogar den Satz aufstellen wollen, daß sich bei der Hefegärung stickstoffhaltige Exkremente aussoheiden, welche von den Hefen selbst nicht weiter als stickstoffhaltiges Nahrungsmaterial ausgenutzt werden können. Sollte es gelingen, die von Ad. Mayer beobachteten Tatsachen im Sinne des von ihm vertretenen Grundsatzes auszulegen, so hätten wir bei der Hefe einen Fall, in dem der Stickstoffwechsel mehr dem der Tiere ähnelt. Kutscher[2]) hat den Gedanken ausgesprochen, daß das proteolytische Ferment der Hefe je nach den herrschenden Bedingungen eine doppelte Funktion ausüben kann: eine analytische und eine synthetische; in lebenden Hefen bei Zufluß von Nahrungsstoffen überwiegt die letztere; in getöteten Hefen jedoch, welche ohne Nahrungssubstrat gelassen werden, kommt die analytische Funktion des Fermentes zum Vorschein, die sich in der alsdann beginnenden Zersetzung des eigenen Eiweißes äußert.

Findet nun in lebenden Hefen während der Gärung nicht nur Synthese, sondern auch Zerfall von Eiweiß statt? Die Entscheidung dieser Frage ist bedeutend erschwert, wenn die Zuckezgärung in Gegenwart stickstoffhaltiger Substanzen stattfindet; in diesem Falle ist es nach Beendigung des Versuches fast unmöglich zu berechnen, welcher Teil des stickstoffhaltigen Materials den Ursprungssubstanzen angehört, und welcher sich als Produkt des Zerfalls des Hefeeiweißes gebildet hat. Die Gärung der Hefe in Zuckerlösung bietet jedoch die Möglichkeit, den stattgefundenen Zerfall des Eiweißes aus den Produkten zu bestimmen, welche sich in der gärenden Flüssigkeit gebildet haben. Stellen wir fest, daß das Eiweiß während der Gärung zerfallen ist, so können wir wieder nicht bestimmen, ob die erhaltenen Zersetzungsprodukte aus abgestorbenen Hefezellen herrühren, oder als Resultat der Lebenstätigkeit der Hefe während der Gärung ent-

[1]) Ad. Mayer, Untersuchungen über die alkoholische Gärung, den Stoffbedarf und Stoffwechsel der Hefepflanze. Heidelberg 1869.

[2]) Zeitschr. f. phys. Chem. **32**, 59. 1901.

standen sind. Nur der letzte Fall kann mit einem solchen Stickstoffverlust eines tierischen Organismus in Parallele gestellt werden, welcher als „Abnützungsquote" bezeichnet wird.

Um Irrtümer zu vermeiden, soll hier noch eine Bemerkung über den Begriff Eiweißzerfall eingeschaltet werden. Der Eiweißzerfall während der Gärung darf durchaus nicht mit demjenigen Eiweißzerfall verwechselt werden, welcher nach der „Eiweißtheorie" der Atmung und Gärung von Pflüger-Detmer stattfinden sollte. Nach dieser Theorie zerfallen während der Atmung Eiweißstoffe des Plasma, während zur Wiederherstellung des durch Atmung verbrauchten Materials nur Kohlehydrate notwendig sind. Heutzutage muß diese Theorie, welche durch Tatsachen nicht bestätigt worden ist, als vollständig aufgegeben gelten. Meine weiteren Beweise sollen nicht als Gründe zu gunsten dieser aufgegebenen Theorie angesehen werden, obzwar ich die Annahme von L. Iwanoff[1]) bestreiten werde, daß bei der alkoholischen Gärung die Eiweißstoffe der Hefe keine Zersetzung erleiden[2]).

Die Veränderung der Stickstoffquantität in Hefen während der Zuckergärung wurde noch zu jener Zeit beobachtet, als Stickstoffbestimmungsmethoden in der Pflanze so unvollkommen waren, daß man von einer genauen Kontrolle dieses Elements kaum reden konnte.

Vor mehr als hundert Jahren trat als erster Thénard[3]), Zeitgenosse von Lavoisier, an die Lösung dieser Frage heran, indem er den Stickstoff aus der Ammoniakmenge berechnete, die er durch trockene Destillation der Hefe erhalten hatte.

In einem Versuch goren 60 g Hefe 4—5 Tage bei 15° C mit 300 g Zucker; nach Abdestillieren und Ausscheidung löslicher Produkte hat sich das Gewicht der Hefe bis auf 40 g vermindert; bei trockener Destillation dieses Quantums erhielt der Verfasser weniger Ammoniak als vor dem Versuch in 60 g Hefe enthalten war. Thénard schreibt: „Je fus étonné d'en retirer par la destillation beaucoup moins d'ammoniaque"; daraus zieht er den Schluß, daß die Menge von Stickstoff in Hefen sich während der Gärung vermindert. Der Verfasser stellte sich die Frage, was aus dem Stickstoff geworden sei. Zuerst vermutete er, daß er sich während der Gärung zusammen mit CO_2 gasförmig ausschiede, kam aber bald von dieser Vermutung ab, weil die von ihm gesammelten 41 Liter Gas von Kalilauge

---

[1]) L. Iwanoff, Zeitschr. f. phys. Chem. **42**, 464. 1904.

[2]) Diese Behauptung wurde als Argument gegen die Theorie von Pflüger-Detmer angeführt.

[3]) Thénard, Ann. de Chim. **46**, 294. 1803.

vollständig absorbiert wurden. Auch im abdestillierten Alkohol fand der Verfasser keinen Stickstoff. Sind Thénards Versuche auch nicht völlig überzeugend — er wußte ja selbst, daß Stickstoff in einer Form existieren kann, welche bei trockener Destillation keinen Ammoniak gibt —, so ist von ihm dennoch die Frage der Stickstoffverwandlung bei der Gärung richtig gestellt worden und seine Lösung hat sich der Wahrheit naheliegend erwiesen.

Pasteur[1]) erkannte auf Grund seiner Versuche an, daß Hefe einen Teil ihres Stickstoffs während der Gärung verliert. Er unterschied die Zuckergärung in Gegenwart und unter Ausschluß von Eiweißstoffen. Der Verfasser verfolgte das Schicksal des Stickstoffs bei der Gärung in reiner Zuckerlösung. Es wurden zum Versuch 100 g Zucker und 1,198 g Hefe, 9,77% Stickstoff enthaltend, genommen und nach der Gärung 1,745 g Hefe, 5,5% Stickstoff enthaltend, zurückgewonnen. Die Hefe hatte also ihr Gewicht, dank Aufnahme stickstoffreier Substanzen, wahrscheinlich von Glykogen, erhöht, aber das absolute Quantum Stickstoffs verkleinerte sich von 117 bis auf 96 mg; es wurde ein vollständig sicheres Resultat erhalten: Ein Teil der stickstoffhaltigen Produkte der Hefe war in Lösung gegangen. Im Versuche Pasteurs ging die Gärung in langsamem Tempo von statten und führte zu einer Vermehrung des Trockengewichts der Hefe, weil Zucker im Überschuß vorhanden war. Duclaux[2]) wiederholte den Versuch Pasteurs; 7 Tage lang hat er 40 g Zucker der Gärung unterworfen; die Stickstoffmenge in der Hefe fiel von 215 g bis auf 148 g, trotzdem den Hefen stickstoffhaltiges Material in Form von apfelsaurem Ammonium zugegeben worden war, das Trockengewicht der Hefe blieb während des Versuchs fast unverändert. Es ist interessant, daß sich unbeachtet der Abnahme von Stickstoff in der Hefe mehr als $^2/_3$ (198 mg aus 282 mg) des hinzugefügten im apfelsauren Ammonium enthaltenen Stickstoffes in gebundenem Zustand vorgefunden hat, d. h. es hat mit Magnesium nicht abdestilliert werden können. Die Schlußfolgerung des Verfassers, daß sowohl der aus Hefen ausgeschiedene Stickstoff als auch das aus apfelsaurem Ammonium assimilierte Produkt in Form von in Flüssigkeit gelöstem Eiweißstoff existieren, ist gänzlich willkürlich, da er nicht versucht hat, die Natur des in der Gärflüssigkeit löslichen Stickstoffes zu bestimmen. Schützenberger[3]) arbeitete mit großen Mengen Hefe; die Gärung vollzog sich rasch, dauerte bloß einige Stunden, aber die Quantität des Stickstoffs in der Hefe fiel von 1,4 g bis auf 0,874 g.

Alle Autoren, welche die Gärung im System — Hefe, Zucker, Wasser — beobachtet haben, sind darin einig, daß die Stickstoffmenge in den Hefezellen fällt, doch kann sich deren Trockengewicht je nach den Umständen entweder vergrößern oder vermindern oder unverändert bleiben.

Liebig[4]) erkannte auch an, daß bei einer gewissen Dauer der Gärung die stickstoffhaltige Substanz aus den Hefezellen in eine zuckerreiche

[1]) Pasteur, Ann. de Chim. **58**, 407. 1860.
[2]) Duclaux, Cpt. rend. **59**, 450. 1864.
[3]) P. Schützenberger, Bull. de la soc. chim. de Paris **21**, 204. 1874.
[4]) Liebig, Annalen d. Chemie u. Pharmazie **153** (I). 1870.

Flüssigkeit heraustritt. Ferner findet in der Kulturflüssigkeit eine Neubildung von Hefezellen statt, welche ihrerseits wieder Stickstoff ausscheiden, so daß der Prozeß monatelang fortdauern kann. Nach Anschauungen Liebigs bleibt jedoch ein Teil des stickstoffhaltigen Materials stets in unlöslichem Zustande in den Hefen; sollte doch der ganze Stickstoff aus den Zellen heraustreten und zum Aufbau neuer Hefeindividuen dienen können, so wäre der Gärungsprozeß ein wahres Perpetuum mobile. Es zeigt sich aber, daß nicht nur die ganze stickstoffhaltige Substanz der Hefe nicht imstande ist, völlig in löslichen Zustand überzugehen, sondern daß auch ein gewisser Teil des Stickstoffes, welcher sich außerhalb der Hefe befindet, nicht als Material zum Neuaufbau der Hefe verwendet werden kann. Nachdem diese Beobachtungen gemacht worden waren, erhob sich die Frage nach der Beschaffenheit der stickstoffhaltigen Exkremente der Hefe. Als Impuls zur Aufnahme diesbezüglicher Arbeiten dienten Versuche Pasteurs. Dieser Verfasser stellte fest, daß der von Kohlensäure und Alkohol befreite Extrakt gegorener Hefe sich als weniger tauglich zu einer neuen Gärung erweist, als der wässerige Auszug aus Hefe, die noch nicht gegoren hatte, obzwar letztere weniger Stickstoff enthält.

Ad. Mayer[1]) hat diese Erscheinung ausführlicher studiert und die Theorie der Hefeexkremente geschaffen. Er ließ sich Hefe in Zuckerlösung in Gegenwart der verschiedensten Stickstoffquellen entwickeln und bestimmte dabei die Mengen der ausgeschiedenen Kohlensäure; es stellte sich heraus, daß keine einzige der Stickstoffquellen eine so üppige Entwicklung der Hefe bewirkte als der Wasserauszug aus Hefen selbst. Aus dem Wasserextrakt frischer Hefe hat Mayer eine Substanz erhalten, welche 4% Stickstoff enthielt; er verglich die Nährkraft derselben mit derjenigen Substanz, welche aus der Flüssigkeit erhalten war, in welcher sich die Gärung vollzog; nach Entfernung der flüchtigen Gärungsprodukte durch Abdampfen und nach Reinigung besaß sie einen Karamelgeruch, war braun gefärbt und enthielt 5,7% Stickstoff. Der Verfasser setzte zu 15proz. Zucker in einem Falle (I) 0,15 g Substanz zu, welche durch Abdampfen aus dem Extrakt gegorener Hefe erhalten war, in einem anderen Falle 0,15 g Substanz aus frischer Hefe (II), besäte beide Kolben mit Reinkultur und beobachtete die Entwicklung der Hefe gemessen an der ausgeschiedenen Kohlensäuremenge. Obzwar im ersten Falle auch mehr Stickstoff vorhanden war, so wurden doch nach 13 Tagen folgende Quantitäten Kohlensäure erhalten: I 204 mg, II 815 mg. Diese Beobachtungen gaben dem Verfasser die Veranlassung, 2 Formen Stickstoff zu unterscheiden: Nahrungsstickstoff und Exkrementstickstoff.

Der soeben beschriebene Versuch Mayers klärt noch nicht die Frage auf über die Natur des stickstoffhaltigen Produktes, welches von Hefen nicht assimiliert wird und sich im Extrakt der „erschöpften" Hefe befindet; unbeachtet des großen Stickstoffinhalts konnte das gegebene Produkt nicht als gute Nahrung dienen; nicht die Quantität, sondern die Qualität

[1]) l. c.

des stickstoffhaltigen Materials hatte Bedeutung für die Hefe. Man konnte auf die Vermutung kommen, daß der begrenzende Faktor bei der Entwicklung der Hefe bei diesen Bedingungen nicht Stickstoff, sondern andere Elemente waren, z. B. die aschenhaltigen. In Erwägung der Bedeutung der letzteren stellte Mayer Versuche über die Gärung in Zuckerlösungen bei Gegenwart verschiedener Quanten von „Wasmanns Pepsin" an, ein stickstoffhaltiges Produkt, das unserem Pepton entspricht. Nachdem die Gärung zu Ende war, filtrierte Mayer die Hefe ab, verdampfte das Filtrat zur Entfernung von Kohlensäure und Alkohol, fügte Zucker hinzu und steckte wieder mit Hefen an. In denjenigen Fällen, wo zunächst weniger Stickstoff hinzugefügt war, wurde eine Verlangsamung der Gärung beobachtet. In sämtlichen Kolben waren gleiche Mengen aschenhaltiger Elemente, war also die Verarmung stickstoffhaltiger Nahrungsmittel die einzige Ursache, welche nach Mayers Meinung die Gärung verlangsamte. Es wurde folgende Schlußfolgerung gezogen: In der Gärflüssigkeit erscheint löslicher Stickstoff, welcher teilweise nicht mehr von der Hefe ausgenutzt werden kann.

Was die Zusammensetzung dieser stickstoffhaltigen Exkremente anbelangt, so ist deren chemische Natur vollständig unbekannt geblieben; Pasteur und Mayer stellten fest, daß diese Substanzen in Wasser löslich sind und durch Alkohol niedergeschlagen werden. Für Verfasser, welche über diese Frage gearbeitet hatten, war der Sinn der Stickstoffausscheidung in die Gärflüssigkeit unverständlich. Liebig l. c., der die Hypothese ausgesprochen hat, daß die Gärung durch den Zustand molekularer Bewegung der Partikelchen hervorgerufen wird, meinte, daß die aus Hefen austretenden stickstoffhaltigen Substanzen in der Gärflüssigkeit molekulare Bewegungen hervorrufen; als Folge solcher Bewegungen erscheint nach Liebigs Meinung u. a. auch die Zuckerinversion in der gärenden Flüssigkeit. Der Verfasser zog eine Parallele zwischen dem Austritt stickstoffhaltiger Produkte aus der Zelle und der fermentativen Wirkung. In einer neuen Auflage seiner Monographie im Jahre 1902 meint Ad. Mayer[1]), daß eine charakteristische Eigenschaft der stickstoffhaltigen Exkremente ihre Unfähigkeit zu einer neuen Assimilation ist; der Verfasser sagt aber garnichts über die chemische Natur dieser Verbindungen.

Sonach war die Frage vom Zerfall der Eiweißstoffe während der Gärung im positiven Sinne entschieden worden. Im Jahre 1904 jedoch trat L. Iwanoff[2]) mit entschiedenen Einwendungen gegen diese Theorie hervor und stellte den früheren Angaben seine Versuche entgegen, welche ihn zu vollständig entgegengesetzten Resultaten führten.

Der Verfasser verhält sich ablehnend zu der Pflüger-Dettmerschen Theorie über die Teilnahme der Eiweißstoffe an der Pflanzenatmung.

[1]) Ad. Mayer, Agrikulturchemie, Gärungschemie. Heidelberg 1902, S. 138 u. 139.

[2]) L. Iwanoff, Zeitschr. f. phys. Chem. **42**, 464. 1904.

Aufgabe L. A. Iwanoffs war, zu verfolgen, wie sich Nucleoproteide während der energischen Kohlensäureentwicklung bei Hefegärung verhalten. Dem Verfasser war es unklar, ob sich Nucleoproteide bei Hefegärung einfach zersetzen oder ob dieselben, ohne unmittelbar teilzunehmen, indirekt wirken, indem sie bei der Zersetzung Zymase ausscheiden. Eine Entscheidung suchte der Verfasser dadurch herbeizuführen, daß er die Veränderung des Proteidstickstoffes während der Gärung verfolgte. Die Versuche wurden im System — Hefe, Zucker, Wasser — ohne Zusatz von Nahrungsstoffen ausgeführt. Hefe wurde durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen, und zwar wurde die Ausfällung in einer Gärflüssigkeit vorgenommen, in welcher durch qualitative Reaktion kein Eiweiß nachgewiesen werden konnte; der Verfasser hatte keine Gründe zu vermuten, daß dort stickstoffhaltige Verbindungen vorhanden sein könnten, welche keinen Eiweißcharakter besitzen und welche durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen werden können. Die Versuche des Verfassers wurden mit käuflichen Preßhefen und mit Reinkulturen von Hefen ausgeführt. Sämtliche Versuche gaben ein vollständig einstimmiges Resultat — die Stickstoffquantität im $Cu(OH)_2$-Niederschlag blieb nach 14tägiger intensiver Gärung unverändert. So wurde im Versuch 2 vor dem Versuch in der Portion 70,35 mg Stickstoff nach Stutzer gefunden, nach dem Versuch 81,12 mg; im dritten Versuch war vor dem Versuch 25,2 mg, nach dem Versuch 25,22 mg; im letzten Fall vollzog sich die Gärung auf 60 proz. Zucker und dauerte 4 Tage bei 25° C, wobei 6 g Zucker (aus 15 g) vergoren waren; die Stickstoffquantität nach Stutzer blieb unverändert, die Menge des nichtproteinartigen Stickstoffs ging in diesem Versuch bis auf 8% herauf, im vierten Versuch sogar bis auf 14%. Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß die Gesamtmenge der Proteide und Eiweißstoffe der Hefe bei der Gärung keine merkliche Veränderung erfährt, weder in bezug auf Synthese, noch in bezug auf Zersetzung. Um der Erwiderung zu entgehen, daß Hefe unter gewissen Bedingungen überhaupt nicht fähig ist, eine Eiweißsynthese auszuführen, setzte der Verfasser in einem Versuch während der Gärung 0,25 g Asparagin zu und beobachtete nach 3 Tagen eine Erhöhung des Proteinstickstoffs von 31,0—41,93 mg.

Nachdem der Verfasser die allgemeine Fähigkeit zur Stickstoffassimilation festgestellt, spricht er die Meinung aus, daß der nichteiweißartige Stickstoff der Hefe nicht als Material zur Synthese dienen kann. Die Resultate der Versuche L. Iwanoffs sollten ihn doch zu der Anerkennung der Theorie Ad. Mayers über Ausscheidung stickstoffhaltiger Exkremente während der Gärung führen; doch er meint, daß die Gärung nicht von einer Ausscheidung solcher „Exkremente" begleitet wird, erklärt vielmehr die Erschöpfung und Stickstoffverarmung der Hefe bei dauernder Zuckergärung durch Verminderung der lebenden Zellen durch Absterben. Stellt man sich auf den Standpunkt des Verfassers, so bleibt diejenige Beobachtung der alten Verfasser unklar, wonach der aus Hefen während der Gärung ausgeschiedene Stickstoff nicht wieder assimiliert werden kann. L. Iwanoff erklärt die Resultate früherer Verfasser (Pasteur, Liebig, Mayer und Schützenberger) durch unvollkommene Anstellung ihrer

Versuche. Der Verfasser weist darauf hin, daß die Versuche während einer längeren Zeit nicht steril geführt worden waren; die Quantität des Nichteiweißstickstoffs in Hefen war groß, die Hefenzellen starben ab, doch konnten sich ihre Zersetzungsprodukte nicht vollständig synthetisieren. Es ist jedoch interessant, hier die Versuchsresultate der kurzdauernden Gärung von Schützenberger und Destrem zu notieren; diese Verfasser vergoren 200 g Zucker in Gegenwart von 100 g Hefe während 24 Stunden und beobachteten auch eine Verminderung von Stickstoff in Hefen während dieses Zeitraumes von 2,81 g bis auf 2,7 g Stickstoff[1]). Indessen wurden in L. Iwanoffs Versuchen auch nach 4tägiger Vergärung keine Spuren von Eiweißzerfall beobachtet. Unwillkürlich trat die Frage auf, ob sich nicht eine solche Verschiedenheit der Resultate durch verschiedene Methodik erklärt.

Sämtliche Schlußfolgerungen L. Iwanoffs basieren auf dem Grundsatz, daß nur Eiweißstickstoff durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen wird; von diesem Standpunkt aus war es vollständig gefahrlos, die Fällung nach Stutzer in der ursprünglichen Gärflüssigkeit auszuführen, wie es der Verfasser getan hat. Sollte es jedoch gelingen, zu zeigen, daß sich bei der Gärung stickstoffhaltige Substanzen bilden, welche keinen Eiweißcharakter besitzen, aber auch durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen werden, so würden die Resultate des Verfassers eine andere Deutung erhalten.

In einer umfangreichen Arbeit näherte sich ferner Pringsheim[2]) der Frage über die Verwandlung des Stickstoffs während der Gärung. Der Verfasser notierte den Widerspruch zwischen den früheren Forschern und L. Iwanoff in dieser Frage. Es scheint Pringsheim theoretisch besonders wichtig, daß sich die Gärung nach L. Iwanoffs Ansicht auch ohne Eiweißzerfall vollziehen kann; dieser Grundsatz widerspricht nicht der Tatsache, daß in einigen Fällen eine Verminderung des Stickstoffgehaltes in Hefen bei der Gärung beobachtet wird. Der Verfasser meint, daß die Hefe zunächst Stickstoff der Lösung entnimmt, sobald aber der Wuchs sich stark vermindert hat oder zu Ende gekommen ist, sich die Ausscheidung von Stickstoff aus den Hefen vollzieht. Pringsheim interessiert die Frage, ob nicht ältere Zellen bei Eintritt der Gärung lösliche stickstoffhaltige Substanzen ausscheiden. Er stellt eine Reihe von Versuchen über Gärung und Entwicklung der Hefe an, indem er minimale Quanten Hefe in 250 ccm Nährlösung sät, welche 15% Zucker und verschiedene Mengen schwefelsaures Ammonium — von 3,026 bis 0,48 g — enthält. Es stellte sich heraus, daß der Verbrauch von Ammoniakstickstoff durch Hefe sich mit der Konzentration des letzteren erhöhte, doch war dessen Verbrauch sehr groß und überstieg bedeutend dasjenige Quantum Stickstoff, welches von Hefen aufgespart war.

---

[1]) Die Verfasser wuschen Hefe vor und nach dem Versuch mit kochendem Wasser und urteilten von der Menge des zerfallenden Eiweißes je nach der Erhöhung des Stickstoffs im Waschwasser nach dem Versuch.

[2]) Diese Zeitschr. **3**, 121. 1907.

Nach 100 Tagen
verminderte sich NH_3-Stickstoff in Lösung 37,8, während Hefe 6,7 mg Stickstoff enthielten;
verminderte sich NH_3-Stickstoff in Lösung 91,0, während Hefe 17,9 mg Stickstoff enthielten;
verminderte sich NH_3-Stickstoff in Lösung 49,7, während Hefe 11,9 mg Stickstoff enthielten.

Der Verfasser nahm willkürlich an, daß sämtlicher Ammoniakstickstoff von Hefen verbraucht wird, wenn sich Ammoniak am Ende des Versuchs nicht abdampfen läßt, obzwar die Stickstoffmenge in Hefen sich ca. 5 mal kleiner erwies[1]).

Der Verbrauch von Ammoniak nimmt mit der Erhöhung der Konzentration von NH_4-Ionen zu, aber im allgemeinen besteht kein Zusammenhang zwischen dem Ammoniumverbrauch und der Gärung während des Wachstumes der Hefe. Anstatt Ammoniak kann man zu Versuchen Asparagin, Leucin und andere Aminosäuren gebrauchen, die analoge Resultate liefern; nimmt man jedoch als Quelle der stickstoffhaltigen Nahrung Pepton, so wird schon ein weniger bemerkbarer Unterschied zwischen der Menge des Stickstoffs in Hefen und dessen Verbrauch aus der Lösung beobachtet. Pringsheim beurteilte den Verbrauch von Stickstoff durch Hefe nach der Verminderung von Ammonium und Aminosäuren in der Nährlösung; er meinte, daß Stickstoff aus diesen Quellen geschöpft wird, von Hefen assimiliert und sich darauf wieder in die Gärflüssigkeit ausscheidet. Es erscheint für den Verfasser selbst fraglich, ob sämtliches gebunden erschienene Ammoniak in seiner Verwandlung durch das Eiweiß der Hefezelle gegangen ist. Der Verfasser rechnet mit der Möglichkeit, daß eine erhöhte Stickstoffkonzentration auf die Hefezelle reizend wirkt; dabei vollzieht sich ein erhöhtes Eindringen von Stickstoff in den Zellensaft, jedoch ohne entsprechende Anreicherung des Eiweißes; im gegebenen Fall könnte eine Anreicherung an Zwischenprodukten stattfinden, ohne jedoch das Endstadium, Eiweiß, zu erreichen. Auch ist die Annahme nicht von der Hand zu weisen, daß die zugesetzten Ammoniumsalze zu Synthesen anderer Produkte geführt haben oder daß bei der Ammoniumnahrung dieses Produkt nicht quantitativ zum Eiweißaufbau verbraucht worden ist, sondern zur Ausnutzung untauglicher Substanzen bildet, welche sich eben ausscheiden. Diese letzte Erwägung rührt von Rubner her, der sich zu den Angaben Pringsheims kritisch verhielt. Der letzte notiert noch in seinen Versuchen, daß sich die Ausscheidung des Stickstoffs aus der Zelle, genauer die Bindung des Ammoniakstickstoffs, erhöht mit der Vergrößerung des Gehaltes von Ammoniakstickstoff in der Nährlösung, mit der Dauer der Gärung und mit der Erhöhung der Temperatur, bei welcher sich die Bindung vollzieht. Angesichts der Versuche von Pringsheim taucht unwillkürlich

[1]) Es ist interessant zu bemerken, daß in Duclaux Versuch mehr als $^2/_3$ des hinzugefügten Ammoniakstickstoffs gebunden wurden (198 mg aus 282 mg), obzwar die Stickstoffmenge in Hefen sich während der Gärung von 215 bis auf 148 mg verminderte.

der Gedanke auf, ob man die Bindung des Ammoniaks nicht durch Gärung und nicht durch die Lebenstätigkeit der Hefe, sondern durch unmittelbare Synthese von Ammoniak und Zucker ohne Einwirkung von Organismen und Fermenten erklären kann. Versuchsresultate der letzten Jahre geben uns die Möglichkeit, Fragen dieser Art zu entscheiden.

W. Palladin und mir[1]) ist es gelungen, die Bindung von Ammoniak in vorläufig autolysierten Hefen zu zeigen, wenn man ihnen Glykose und Phosphat zusetzt. So ist im Versuch 5 die Autolyse von 10 g Hefanol in 150 ccm Wasser vor sich gegangen; nach Verlauf von 5 Tagen war das Quantum von Ammoniakstickstoff, welches bei 40° C und 15 mm Druck abgedampft wurde, gleich 29,0 mg. Fügte man darauf zu diesen Portionen je 25 g Glykose und je 4 g KH_2PO_4 hinzu und dampfte das Ammoniak nach Verlauf von weiteren 4—5 Tagen ab, so wurde während dieser Zeit eine Bindung von Ammoniumstickstoff bemerkbar, dessen Quantität bis auf 19,2 mg gefallen war; die Synthese erreichte 33% des ursprünglichen Quantums. Noch genauere Resultate haben wir bei Zusatz von Leucin erhalten. Unsere Versuche wiesen auf die Abhängigkeit des nach der Autolyse bestimmten Ammoniumquantums von der Menge der Substanzen, welche durch Phosphorwolframsäure niedergeschlagen werden. Bei Verminderung von Ammoniak erhöhte sich die Menge des von Phosphorwolframsäure niedergeschlagenen Stickstoffs. Unsere Versuche über Ammoniumbindung verliefen ohne jeglichen Einfluß der Gärung, nach 5tägiger Autolyse der Hefe; in diesem Falle konnte man natürlich nicht von der Arbeit der Zymase reden, dennoch haben wir damals diese Erscheinung für einen fermentativen Prozeß gehalten. Nach den Arbeiten von Kostitschew und W. Brilliant, l. c., soll eine freie Bindung von Aminosäuren und Ammoniak mit Zucker anerkannt werden. Sie beobachteten einen bedeutenden Verbrauch von Ammoniak in denjenigen Versuchen, in welchen Ammoniak künstlich hinzugefügt wurde; diese Erscheinung vollzog sich, sobald man zu Hefen nach der Autolyse Zucker und kohlensaures Ammonium hinzufügte und die Ansätze im Thermostaten bei 55° C stehengelassen hat. Es zeigte sich weiter, daß die Synthese nicht nur unabhängig von Hefefermenten vor sich ging, sondern daß die Gegenwart der Hefe selbst für den Verlauf dieser Reaktion gar nicht notwendig war. 4 g Glykose mit 0,4 g $(NH_4)_2CO_3$ und 0,5 g Glykokoll wurden in Gegenwart von 10 ccm Wasser 3 Tage bei 55° C ohne Hefe aufbewahrt; am Ende des Versuchs ergab die Versuchsportion 42,0 mg Stickstoff nach Stutzer. Eine Anwesenheit von Stickstoff im Niederschlag von Kupferhydroxyd zeigte sich auch bei gegenseitiger Wirkung von kohlensaurem Ammonium und Zucker.

Sonach müssen sämtliche Synthesen und Bindungen von Ammoniak und Aminosäuren mit Zucker mit der Erscheinung der

[1]) W. Palladin und N. Iwanoff, Zur Kenntnis der gegenseitigen Abhängigkeit zwischen Eiweißabbau und Atmung der Pflanzen II. Diese Zeitschr. **42**, 325. 1912.

Bildung huminöser Substanzen, welche von Maillard (l. c.) beschrieben ist, in Parallele gestellt werden. Zwar sprach Maillard nur von der Bindung der Aminosäuren mit Zucker, doch wurde in der letzten Zeit von A. Trussoff[1]) der Gedanke ausgesprochen, daß die von Maillard beobachtete Erscheinung durch Veränderung der Kohlenhydrate unter Einfluß von Ammoniak bedingt wird, wobei sich Ammoniak aus der Aminogruppe der Aminosäure bildet. Einstweilen kann noch nicht gesagt werden, daß es so ist; überhaupt harrt noch die chemische Struktur der erhaltenen Verbindungen ihrer Untersuchung, doch ist das eine sicher, daß nicht nur Aminosäuren, sondern auch Ammoniak mit Zucker ohne Einfluß von Fermenten in Verbindung treten können. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt von der Konzentration der reagierenden Lösungen und von der Temperatur ab. In S. Kostitscheffs und W. Brilliants Versuchen ging die Stickstoffsynthese in Gegenwart von 40 proz. Glukose vor sich, doch habe ich diese Erscheinung auch bei niedriger Zuckerkonzentration — bis 1% — beobachten können; selbstredend wurden mit der Verminderung der Konzentration immer kleinere Quantitäten des gebundenen Stickstoffs erhalten.

Als die Möglichkeit der Bindung von Aminosäuren und Ammoniak mit Zucker ohne jeglichen Einfluß von Fermenten klar wurde, erschien es notwendig, die Resultate dieser Synthese bei allerlei physiologischen Prozessen in Rechnung zu ziehen, wo diese Substanzen gleichzeitig zusammentreffen.

Von diesem Standpunkte aus können die oben beschriebenen Versuche Pringsheims über die Gärung leicht eine Erklärung finden. In seinen Versuchen befand sich eine 15 proz. Zuckerlösung 100 Tage lang mit schwefelsaurem Ammonium zusammen; Ammoniak verschwand, weil es in direkte Verbindung mit Zucker trat, wobei sich Verbindungen bildeten, aus welchen Ammoniak nicht abgetrieben werden konnte. Daraus erhellt, warum zuweilen 5 mal mehr Ammonium verschwand, als sich in Hefen Stickstoff anreicherte, und warum sich die nicht mehr nachweisbare N-Menge nicht proportional seines Verbrauchs durch Hefe vergrößert, sondern proportional der Konzentration von schwefelsaurem Ammonium. Wir wissen, daß die Erhöhung der Konzentration der-

[1]) A. Trussoff, Materialien zum Studium des Bodenhumus. I. Teil. Petrograd 1917.

artige Synthesen fördern kann. Die von Pringsheim beobachtete Bindung von Ammoniak während der Gärung und Lebenstätigkeit der Hefe spricht zu gunsten einer Bildung stickstoffhaltiger Substanzen, deren Anwesenheit Ad. Mayer veranlaßte, von stickstoffhaltigen Exkrementen der Gärung zu reden. Diese Verbindungen bilden sich meiner Meinung nach unabhängig von der Gärung und überhaupt unabhängig von Hefen; die Anwesenheit der letzten kann nur eine zur Synthese von Glykose mit Aminosäuren und Ammoniak äußerst günstige Sphäre schaffen.

Der Grundsatz L. Iwanoffs von der Unzersetzlichkeit des Hefeeiweißes während der Gärung basiert darauf, daß in Versuchen, in welchen sich eine energische, doch kurzdauernde Hefegärung abspielte, keine Stickstoffverminderung nach Stutzer beobachtet wurde. L. Iwanoffs Versuche wurden in einigen Fällen in 60proz. Zuckerlösungen ausgeführt; unbeachtet ihrer kurzen Dauer konnten hier Synthesen vom Typus Maillards auf Kosten des Stickstoffs der Aminosäuren beobachtet werden; die dabei synthetisch gebildeten Substanzen werden vom Kupferhydroxyd niedergeschlagen; sollte die Bindung von Aminosäuren mit Zucker während der Gärung wirklich Platz greifen, so konnten in diesem Falle, bei der Fällung nach Stutzer, stickstoffhaltige Verbindungen, welche keinen Eiweißcharakter besitzen, in Rechnung kommen und den Stickstoff der während der Gärung zerfallenen Eiweißstoffe kompensieren.

Der von vielen Forschern konstatierte Zerfall der Eiweißstoffe während der Gärung wurde durch L. Iwanoffs Arbeiten nicht nur in Zweifel gezogen; vielmehr zählte seine Ansicht in dieser Frage bis zur letzten Zeit zu den allgemein anerkannten. Sollte es gelingen, zu zeigen, daß während der Gärung stickstoffhaltige Verbindungen nach Maillard entstehen, welche den Eiweißzerfall maskieren, so wären überhaupt keine neuen Beweise für den Zerfall des Eiweißes während der Gärung nötig, es würde genügen, sich auf diesbezügliche klassische Arbeiten über die Gärung zu beziehen. Doch bevor ich zum Berichte meiner Versuche übergehe, will ich noch die Angaben der obenerwähnten Arbeit Rubners anführen, dessen Standpunkt dem L. Iwanoffschen entgegengesetzt ist.

Rubner untersucht die Arbeiten derjenigen Verfasser, welche den Stickstoffverlust bei Hefen während der Gärung in stickstoffreier Umgebung

beobachteten; diese Verfasser äußern die Meinung, daß dieser Prozeß in Parallele gestellt werden kann mit der Eiweißverwandlung bei höheren Tieren. Derjenige unbedingt notwendige Eiweißverlust im tierischen Organismus, welchen Rubner als „Abnützungsquote" bezeichnet hat, kann seiner Meinung nach mit dem bei der Hefegärung eintretenden Stickstoffverluste verglichen werden. Rubner verhält sich kritisch zu Pasteurs Versuchsbedingungen und nimmt besonders daran Anstoß, daß große Mengen Hefe in die Gärflüssigkeit eingetragen worden waren, als der N-Verlust beobachtet wurde. Unanfechtbar erscheinen Rubner nur Versuche mit einem Überschuß von Zucker; äußerst wahrscheinlich findet er die von Ad. Mayer betonte Analogie der unausnutzbaren N-haltigen Ausscheidungen von Hefen mit denen des tierischen Organismus. Er unterscheidet scharf 2 Formen von Hefeeiweißzerfall: Die Autolyse ohne Nährmittel und die Gärung bei ungenügendem Nährmaterial; im letzten Fall sind die Hefen zu einer „inneren" Ausnutzung der eigenen lebenden Substanz gezwungen, was von einem unzertrennbaren Zusammenhang dieses Prozesses mit dem Leben zeugt und auch zu dessen Gleichsetzung mit den „Abnützungsvorgängen" der tierischen Zelle Veranlassung gibt.

Zu seinen Versuchen schreitend, kritisiert Rubner L. Iwanoffs Angaben über Unzersetzlichkeit des Eiweißes während der Hefegärung. Vom physiologischen Standpunkte aus erscheint Rubner eine vollständige Beseitigung der Eiweißrolle bei Nährprozessen unwahrscheinlich. Rubner ficht auch L. Iwanoffs Methodik an; die Fällung nach Stutzer[1]) ist seiner Meinung nach ein nur ungenaues Verfahren zur Eiweißbestimmung; auf Schjernings[2]) Studien über Stutzers Methode Bezug nehmend, vermutet Rubner, daß durch Kupferhydroxyd auch Eiweißzerfallprodukte niedergeschlagen werden, was auch Bross's Versuche wahrscheinlich machen. Zu dieser Vermutung kommt Rubner, indem er die sehr kleinen Quantitäten Stickstoff in Erwägung zieht, welche L. Iwanoff aus dem Filtrat gegorener Hefe nach der Fällung nach Stutzer gewonnen hat. In einem Versuch Rubners sind 29,82 mg Hefestickstoff in das Zentrifugat[3]) übergegangen, nachdem der Hefe in Wasser vor der Fällung mit $Cu(OH)_2$ erhitzt worden ist, wie es die Methode Stutzers verlangt. Jedoch sind im Filtrat einer gleichzeitig angesetzten Portion Hefe nach der Fällung mit $Cu(OH)_2$ bedeutend kleinere Quantitäten löslichen Stickstoffs geblieben. In seinen Versuchen hat Rubner die Hefe stets vor und nach der Zuckergärung abzentrifugiert; nach der Verminderung des Stickstoffs in Hefen konnte der Verfasser das Quantum Stickstoff beurteilen, welches während der Gärung in Lösung gegangen ist, jedoch nicht von einem Zerfall der Eiweißstoffe herzurühren brauchte, weil der Übergang der Eiweißstoffe

[1]) Stutzer, Journ. f. Landw. **28**, 103. 1880.

[2]) Schjerning, H., Zeitschr. f. analyt. Chemie **39**, 345, 663. 1900.

[3]) Rubners Einwendungen können in diesem Punkte nicht als überzeugend angesehen werden, weil ein Teil der Eiweißstoffe während der Zentrifugierung in Lösung übergehen konnte und nach Stutzer auch lösliche Eiweißstoffe niedergeschlagen werden.

in Lösung nicht auf ihre Spaltung hinweist. Sonach können sich Angaben der Versuche Rubners und die nach der Methode Stutzers erhaltenen Resultate stark unterscheiden. Rubner beobachtete die Gärung von 5 g Hefe mit 120 mg Stickstoff in 10 proz. Saccharoselösung bei 36—38° C; nach Verlauf von 24 Stunden wurde die Hefe zentrifugiert, die Lösung abgegossen, zu der Hefe von neuem eine Zuckerlösung hinzugefügt und die Hefe wieder der Gärung überlassen usw. bis 6 mal. Es stellte sich heraus, daß sich die Stickstoffmenge in der Hefe vermindert hatte, die Zahl des Stickstoffinhalts für einen bestimmten Tag ist gleich der Stickstoffmenge für den vorigen Tag multipliziert mit dem Koeffizienten 0,86.

Es	wurde	Stickstoff	in	Hefen	bei	Anfang	. . . .			120 mg	bestimmt;	
„	„	„	„	„	am	Ende	des	1.	Tages	112 „		„
„	„	„	„	„	„	„	„	2.	„	92 „		„
„	„	„	„	„	„	„	„	3.	„	77 „		„
„	„	„	„	„	„	„	„	4.	„	63 „		„
„	„	„	„	„	„	„	„	5.	„	52 „		„
„	„	„	„	„	„	„	„	6.	„	43 „		„

Dabei verminderte sich in einer gewissen Proportion auch die Gärkraft der Hefe (Koeff. = 0,64). Der Verlust an Gärkraft schreitet also in größerer Progression fort als der Verlust der Stickstoffmenge in der Hefe. Wenn sich auch die Gärkraft mit dem Verlust derjenigen stickstoffhaltigen Hefesubstanz vermindert, welche als lebend angesehen werden muß, so darf doch nach Ansicht des Verfassers der ganze aus Hefen ausgeschiedene Stickstoff nicht auf Rechnung der stickstoffhaltigen lebenden Substanz gesetzt werden. Rubner weist auf die alten Versuche Hayducks[1]) hin, welcher bemerkte, daß sich eine Erhöhung der Gärkraft in Hefen überhaupt mit der Erhöhung des Stickstoffinhalts bemerkbar macht und meint, daß der allmähliche Verlust an Stickstoff in Hefen während der Gärung zur Abschwächung der Gärungsenergie führt. Des weiteren hebt Rubner hervor: „Danach war der N-Verlust um so größer, je stürmischer die Gärung" und macht auf die Abhängigkeit des N-Verlustes von der Temperatur aufmerksam. So gaben 5 g Hefe mit 10 proz. Zucker nach 3 Tagen Gärung folgenden Stickstoffverlust in % pro Tag:

bei 22° C	7,32%
„ 28° „	11,3 „
„ 39° „	16,6 „

Nachdem Rubner den allmählichen Stickstoffverlust bei der Gärung bemerkt hat, nahm er Hefeproben und versuchte deren Fähigkeit zur Kultur auf Bierwürzeagar; es stellte sich heraus, daß während die Mengen der Stickstoffverminderung gleichmäßig sind, der Verlust an Kulturfähigkeit in einer viel schnelleren Progression vor sich geht. Die Gärkraft war noch am 6. Tage groß, während zu dieser Zeit nur ein ganz unbedeutender Teil der Hefe (0,02%) geblieben ist, welcher zur weiteren Kultur fähig

[1]) Hayduck, M., Zeitschr. f. Spiritusind. 14, 173, 174. 1880.

war; dabei verminderte sich die Zahl der Hefezellen nicht. Sonach kann der Stickstoffverlust nicht einer etwaigen Lösung der abgestorbenen Zellen zugeschrieben werden. Der Verfasser stellte vergleichende Versuche an: 1. Hefe + Zucker, 2. Hefe + Wasser; es stellte sich heraus, daß in den ersten 24 Stunden der Stickstoffverlust in Zucker größer war als in der Wasserportion (13,2% gegen 11%); doch besaß der Stickstoffverlust einen verschiedenen Charakter; im Wasser ging ein autolytischer Prozeß vor sich, während sich in Zuckerlösung eine Zersetzung des stickstoffhaltigen Materials in nichtassimilierbare Auswurfsubstanzen vollzog. Bei dauernder Hefekultivierung in Zucker kann sich eine Stickstoffausscheidung aus den Zellen auch unabhängig von der Gärung ereignen; dank der Autolyse entsteht dabei eine partielle Zersetzung der abgestorbenen Substanz.

Sonach hängt der Stickstoffverlust während der Gärung von einer einerseits mit dem Lebensprozeß verknüpften Funktion ab, andererseits von den mit dem allmählichen Absterben der Hefe verbundenen Erscheinungen. Im allgemeinen bezweifelt aber der Verfasser nicht im geringsten, daß Hefe, welche in einer stickstoffreien Umgebung gärt, einen Stickstoffverlust erleidet und kommt weiterhin zu dem Schluß: „Alles in allem genommen, trägt dieser N-Verlust den Stempel eines echten biologischen Prozesses."

Rubner bestimmte die Gärungsenergie mit der calorimetrischen Methode und meinte, daß die Gärung sich aus einer Lebens- und einer enzymatischen Zersetzung des Zuckers zusammensetzt; dieser Prozeß findet bei der Hefegärung in Gegenwart von Toluol statt.

Gegen diese eigentümlichen Ansichten Rubners über die Gärung trat der Begründer der enzymatischen Gärungstheorie, E. Buchner[1]), auf. Er weist daraufhin, daß bei der Gärung mit Toluol in 60 proz. Zuckerlösung die Kohlensäureentwicklung fast aufhört, nicht, weil in lebenden Zellen die Enzyme vernichtet werden, sondern weil der Zucker nicht in das Innere der Zelle eindringen kann; nun erklärt Buchner die Resultate vieler Versuche Rubners dadurch, daß Rubner die Anwesenheit des Koenzymes nicht in Rechnung gezogen hat. Laut Buchner bildet sich in lebenden Hefen das Koenzym sogar bei Zuckergärung in Abwesenheit stickstoffhaltigen Materials (das letzte ist für das Koenzym anscheinend auch nicht nötig). Führt man diesen Faktor in das Studium der Gärung ein, so wird man Rubners Versuchen über proportionale Verminderung der Gärkraft in Abhängigkeit von der Stickstoffverminderung eine andere Deutung geben müssen.

Jedenfalls zeigte Rubner, daß sich aus den Hefen bei der Gärung stickstoffhaltige Substanzen ausscheiden; ihre Natur bleibt unaufgeklärt. Nägeli[2]) und Hayduck machten darauf aufmerksam, daß diese Verbindungen durch Phosphorwolframsäure niedergeschlagen werden; doch kann man in denselben jedenfalls nicht Peptone erkennen (Nägeli), weil anders schwer zu verstehen wäre, warum L. Iwanoff in der Gärflüssigkeit

[1]) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. 47, 853. 1914.

[2]) C. Nägeli, Theorie der Gärung, 1879.

keine Biuretreaktion erhalten konnte. Lintner[1]) beobachtete Substanzen, die sich bei der Gärung bilden und durch Phosphorwolframsäure niedergeschlagen werden, wenn Hefe mit Asparagin in 20 proz. Saccharose genährt wurde; in diesem Falle ging bis 50% des ursprünglich hinzugefügten Stickstoffs in eine solche Substanz über, doch wenn das Quantum Hefe klein war und die Konzentration der Saccharose bis 10—12% fiel, so wurden nur wenig durch Phosphorwolframsäure fällbare Substanzen erhalten.

Nach allen Angaben verliert sonach die Hefe während der Gärung Stickstoff, doch ist es unter diesen Bedingungen L. Iwanoff nicht gelungen, einen Eiweißzerfall zu beobachten. Vielleicht liegt der Schwerpunkt der Sache in der Methodik der Bestimmung des Eiweißstickstoffs, wie ich schon oben erwähnt habe.

Ich habe mich schon früher überzeugen können[2]), daß bei Anwendung der Methode Stutzers manchmal Kupferniederschläge erhalten werden, welche fast gleiche Stickstoffmengen enthalten, die sich dem Charakter der in ihnen enthaltenen stickstoffhaltigen Verbindungen nach unterscheiden; so wurden in einem Niederschlag bei der Hefeautolyse 48,8 mg Stickstoff, in einem anderen 48,4 mg erhalten; fällte man jedoch parallele Portionen mit essigsaurem Blei und darauf das erhaltene Filtrat mit Kupferhydroxyd, wie es S. Kostitscheff und W. Brilliant in der oben zitierten Arbeit machten, so stellte sich heraus, daß der $Cu(OH)_2$-Niederschlag im ersten Falle 19,1 mg, im zweiten 29,1 mg Stickstoff enthielt; dieser Stickstoff besitzt ohne Zweifel keinen Eiweißcharakter, da er nach Beseitigung der Eiweißstoffe und Peptone durch Blei erhalten wurde; er maskierte daher im Kupferniederschlag den Eiweißzerfall. Wir müssen also, um authentische Zahlen des nach dem Zerfall gebliebenen Eiweißstickstoffs zu erhalten, welcher ursprünglich durch $Cu(OH)_2$ niedergeschlagen wurde, d. h. von 48,8 und 48,4 mg resp. 19,1 und 29,1 mg Stickstoff abziehen, der wissentlich keinen Eiweißcharakter besitzt; im Resultat bleiben im ersten Falle 29,7 mg, im zweiten 19,3 mg Eiweißstickstoff; den ursprünglichen Angaben gemäß wurde jedoch kein Unterschied zwischen diesen zwei Portionen erhalten.

Für meine Versuche gebrauchte ich reine Hefe der Fabrik Karjakin in Kursk, welche auf spezielle Bestellung erhalten wurde. Die Gärung war von kurzer Dauer, 24—48 Stunden. Mit Ausnahme einiger Versuche wurde kein Antiseptikum hinzugefügt. Die Versuchsresultate zeigten einstimmig, daß während der Zeit der ener-

[1]) Lintner, Wochenschr. f. Brauer **1**, 3. 1884.

[2]) N. N. Iwanoff, Journ. d. russ. botan. Ges. **1**, 113. 1916.

gischen Gärung keine Mikroorganismen in der Flüssigkeit erschienen; die bakteriziden Eigenschaften der Hefe kamen vollständig klar zum Vorschein; die von gegorenen Hefen abfiltrierten Produkte, die 5—7% Spiritus enthielten, blieben während 2 Wochen ohne jede Spur von Ansteckung. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 24—31° C ausgeführt. Die Fällung der Eiweißstoffe wurde entweder mittels $Cu(OH)_2$ oder essigsauren Bleis vorgenommen; nach der Fällung mit Blei wurde im Filtrat zuweilen der Stickstoff nach Stutzer bestimmt. Im letzten Falle hatte man die Absicht, Produkte der Synthese von Aminosäuren mit Zucker einzufangen, welche durch $Cu(OH)_2$, aber nicht durch essigsaures Blei niedergeschlagen werden. Zur Eiweißbestimmung wurden auch andere Fällungsmittel gebraucht: 5proz. Lösung von Quecksilbersublimat, Tannin, essigsaures Uran. Die stickstoffhaltigen Niederschläge wurden nach Kjeldahl verbrannt.

Versuch 1: 40 g lebender Hefe wurden sorgfältig mit 200 ccm Wasser und 20 g Zucker vermischt. Daraus wurden mit der Pipette Portionen von je 20 ccm genommen. Die Gärung dauerte 36 Stunden bei 25° C. Die Fällung wurde durch essigsaures Blei oder durch $Cu(OH)_2$ erzeugt, wobei die Gärflüssigkeit nicht abgesondert wurde. In Niederschlägen wurden folgende Mengen Stickstoff in Milligramm erhalten:

	Kontrolle		Nach 36 Stunden[1])	
mg N im Niederschlag von essigsaurem Blei	82,8 82,4	82,6	79,4 79,4	79,4
mg N im Niederschlag von $Cu(OH)_2$	73,7 74,4	74,1	78,2 78,0	78,1

Schon der erste Versuch zeigte, daß, wenn man Stickstoff nach Stutzer bestimmt, eine vollständige Bestätigung L. Iwanoffs Angaben gefunden wird, hat sich doch die Menge von Eiweißstickstoff nicht nur nicht vermindert, sondern sogar erhöht (von 74,1 bis auf 78,1); eine unbedeutende Stickstofferhöhung im $Cu(OH)_2$-Niederschlage wurde auch von L. Iwanoff in einem seiner Versuche (75) beobachtet, wo vor der Gärung 80,35 mg und nach derselben 81,12 mg Stickstoff nach Stutzer bestimmt wurden. Im Gegensatz hierzu zeigte die Fällung durch essigsaures Blei, daß sich die Menge von Eiweißstickstoff während der Gärung von 82,6 bis zu 79,4 mg verminderte. Wie ist ein solcher Unter-

[1]) Nach 12 Stunden energischer Gärung, als die Fehlingprobe die Abwesenheit von Zucker bezeugte, wurden noch je 2 g hinzugefügt.

schied zu erklären? Ich habe Filtrate der Portionen, welche mit essigsaurem Blei niedergeschlagen waren, nach Stutzer gefällt und stellte fest, daß, während Kontrollportionen gar keinen Stickstoff im $Cu(OH)_2$-Niederschlage aufwiesen, Portionen, welche 36 Stunden gegoren hatten, im Kupferniederschlage 3,8 mg Stickstoff enthielten. Daraus muß folgende Schlußfolgerung gezogen werden: während der Gärung sind stickstoffhaltige Substanzen aufgetreten, welche keinen Eiweißcharakter besitzen und nach Stutzer niedergeschlagen werden.

Die weiter folgenden Versuche über Gärung wurden bei einer Temperatur von 31° C ausgeführt.

Versuch 2: 50 g lebender Hefe wurden mit 250 ccm 10 proz. Saccharose durchgerührt; mit einer Pipette wurden Portionen von je 20 ccm abgenommen. Die Gärung vollzog sich bei 31° C. Der Gesamtinhalt von Stickstoff in der Portion war 104,2 mg. Die Fällung wurde durch essigsaures Blei oder durch Kupferhydroxyd erzeugt. Es wurden folgende Mengen Stickstoff in Milligramm in den Niederschlägen erhalten:

	Pb.		$Cu(OH)_2$	
Kontrollportion	93,4 93,8	93,6	90,2 90,6	90,4
Nach 24stündiger Gärung[1])	83,2 83,0	83,1	94,3 —	94,3
„ 48 „ „	77,2 77,2	77,2	82,3 83,2	83,0
„ 72 „ „	61,8	61,8	—	—

Nach Fällung mit Blei wurde das Filtrat mit $Cu(OH)_2$ niedergeschlagen; es wurde Stickstoff in mg

Kontrollportion	Nach 24stünd. Gär.	Nach 48stünd. Gär.
1,0	6,0	7,6

erhalten.

Der Versuch zeigt, daß der Eiweißzerfall schon nach 24 Stunden viel schärfer beobachtet wird, als im vorhergehenden Versuch; zu Anfang war 93,6 mg, nach 24 Stunden blieb 83,1 mg und nach 48 Stunden bereits 77,2 mg; jedoch nur in dem Fall, als die Fällung mit essigsaurem Blei stattgefunden hatte, fällte man nach Stutzer,

[1]) Nach 10 Stunden war der ganze ursprünglich hinzugefügte Zucker vergoren und sind weitere 2 g hinzugefügt worden, doch ist nach 24 Stunden, von Beginn der Gärung an gerechnet, der Zucker wieder verschwunden; die darauf weiter hinzugefügten 2 g sind jedoch auch nach 72stündiger Gärung nicht vollständig verschwunden.

so hat sich das Stickstoffquantum nach 24 Stunden sogar etwas erhöht (von 90,4 bis auf 94,3 mg) und fast nach 48 Stunden fällt dieses Quantum bis auf 83,0 mg; doch der im Filtrat vom Blei nach Stutzer gefällte Nichteiweißstoff wächst von 1 mg in der Kontrollportion bis 6,0 mg nach 24 Stunden und bis 7,6 mg nach 48 Stunden; diese Erhöhung erklärt uns den Zuwachs von Stickstoff nach Stutzer von 90,4—94,3 mg während 24stündiger Gärung; eine starke Anreicherung an Nichteiweißstoff, der durch Kupferhydroxyd gefällt wird, ist während der ersten Stunden der Gärung zu bemerken. Der Nichteiweißstickstoff steigt nicht in dem Maße, wie der Eiweißstickstoff fällt; deshalb sehen wir im Anfang eine Steigerung von Stickstoff nach Stutzer; zuweilen sind die Mengen Stickstoff in der Kontroll- und in der Versuchsportion gleich, wie es öfters in L. Iwanoffs Versuchen der Fall war, und bei mir im nächstfolgenden Versuch. Jedoch sogar dann, wenn sich der Stickstoff in den $Cu(OH)_2$-Niederschlägen der Kontroll- und Versuchsportionen quantitativ nicht unterscheidet, ist der qualitative Bestand der stickstoffhaltigen Verbindungen immer verschieden, weil die Versuchsportion stets ein viel größeres Quantum von Nichteiweißverbindungen enthält, welche nach Stutzer niedergeschlagen werden, als die Kontrollportion.

In den beschriebenen Versuchen wurde Zucker mehrmals hinzugefügt, nach Maßgabe seiner Vergärung, zuweilen wurden kurzdauernde Perioden beobachtet, wo gar kein Zucker in Lösung war; sonach konnten Einwendungen gemacht werden, daß der Eiweißstickstoff zu der Zeit zerfiel, als die Gärung wegen Zuckermangels in Stockung geraten war, deshalb wurde ein Versuch angestellt, in welchem so viel Zucker hinzugefügt wurde, daß er bis zum Schluß des Versuchs ausreichte.

Versuch 3: 25 g lebender Hefe wurden sorgfältig mit 250 ccm Wasser und 50 g Zucker vermischt und davon 9 Portionen gleichartiger Masse zu je 30 ccm genommen. Die Gärung vollzog sich 24 Stunden lang bei 31° C. In einer Portion wurde die ausgeschiedene Kohlensäure nach der Gewichtsmethode bestimmt, in kleinen Kolben, welche mit Meißls Ventilen geschlossen waren.

Ursprünglich war 5,5 g Zucker in der Portion; nach 24 Stunden hatte sich 2,37 g CO_2 ausgeschieden, war sonach der größte Teil des Zuckers vergoren.

Die Portionen wurden mit essigsaurem Blei und nach Stutzer gefällt. In den Niederschlägen waren folgende Mengen Stickstoff in Milligramm erhalten:

	Kontrollportion		Nach 24stünd. Gär.	
Pb	81,8 81,4	81,6	76,9 76,4	76,6
$Cu(OH)_2$	76,6 77,0	76,8	76,6 76,3	76,5

Nach der Fällung mit Blei wurde das Filtrat nach Stutzer bearbeitet; im $Cu(OH)_2$-Niederschlage wurde Stickstoff in Milligramm erhalten:

Kontrollportion	0,8 mg
Nach 24stünd. Gärung	2,8 3,0 — 2,9 mg

Die Resultate der Fällung mit $Cu(OH)_2$ weisen auf ein Ausbleiben des Eiweißzerfalls hin, doch ändert sich das Bild, wenn man in die erhaltenen Resultate — Kontrollportion 76,8, und Versuchsportion 76,5 mg — Korrekturen einführt, d. h. wenn man von diesen Zahlen den Stickstoff subtrahiert, der wissentlich keinen Eiweißcharakter besitzt, namentlich im ersten Fall 0,8 mg, im zweiten 2,9 mg; dann wäre vor dem Versuch — 76,0 mg (76,8—0,8), und nach 24stündiger Gärung — 73,6 mg (76,5—2,9); in diesem Falle gab sich der Eiweißzerfall ebenfalls zu erkennen, wenn auch in einer weniger präzisen Weise, als im Falle der Eiweißbestimmung durch essigsaures Blei. Die Ungleichheit der Bedingungen, unter welchen die Fällung von statten ging: in den Kontrollportionen war Zucker anwesend, in Versuchsportionen Alkohol, hat, wie Kontrollversuche zeigten, keinen Einfluß auf das Resultat der Eiweißfällung.

Sonach vollzog sich unter den Bedingungen meiner Versuche bei der Hefegärung ein Eiweißzerfall, und nicht nur eine Ausscheidung von Stickstoff aus der Hefezelle, wie aus den Angaben Rubners hervorgeht. Letzterer stellte diesen Prozeß mit der Gärung in Parallele und meinte, daß jede Gärung einen Stickstoffverlust zur Folge haben muß. In Rubners Vergleichsversuchen wurde sogar beobachtet, daß der Verlust an Stickstoff in Hefen bei der Gärung höher ist, als der Verlust in Hefen, welche während derselben Zeit ohne Zucker gelassen sind; dagegen erscheint die Anwesenheit von Zucker nach sämtlichen bisher bekannten Angaben als Faktor, der den Eiweißzerfall hindert. Im nächsten Versuch vergleiche ich den Eiweißzerfall in Hefen, welche gegoren haben und eine gleiche Zeit ohne Toluol autolysiert worden waren.

Versuch 4: 100 g lebender Hefe der Fabrik Kalinkin wurden mit 350 ccm Wasser vermischt und daraus Proben von je 20 ccm abgenommen. Die sauere Reaktion der Portionen wurde durch eine verdünnte Lösung

von Ätznatron beseitigt. Zu den Portionen 7—10 wurden je 6 g Zucker hinzugefügt. Der Eiweißstickstoff wurde im Niederschlage von essigsaurem Uran bestimmt. Es wurde Stickstoff in Milligramm erhalten:

Kontrollportionen:

1. . . . . 130,2 } 130,1 mg
2. . . . . 130,0 }

	Wasserportionen			Zuckerportionen[1])		
Nach 10 Stunden	3 . 122,3	122,5		7 . . . 124,1	124,0	
	4 . 122,6			8 . . . 123,9		
„ 31 „	5 . 112,4	112,1		9 . . . 116,6	116,6	
	6 . 111,8			10 . . . —		

Es zerfiel Eiweiß in Milligramm vom Eiweißstickstoff:

	In Wasser	In Zucker
Nach 10 Stunden	7,6 mg	6,1 mg
„ 31 „	18,0 „	13,5 „

Der Zerfall von Eiweiß ist ganz deutlich zu beobachten; in Portionen ohne Zucker war der Zerfall etwas größer als in denjenigen, wo in Gegenwart von Zucker eine Gärung stattfand. Die Gärung förderte die Zerspaltung des Eiweißes nicht, erschien im Gegenteil als ein etwas hemmender Faktor; als nächstliegende Ursache, welche diese Hemmung hervorruft, ist die Alkoholanreicherung während des Gärungsprozesses anzunehmen.

Im nächsten Versuch wurde zur Fällung der Eiweißstoffe essigsaures Blei angewandt; außerdem hat die Hefe infolge einer vorhergehenden Gärung einen bedeutenden Teil des Kofermentes verloren, wodurch ihre Gärkraft bedeutend abgeschwächt war.

Versuch 5: 40 g lebender Hefe wurden nach 3tägiger Gärung von der Gärflüssigkeit abfiltriert und darauf mit 100 ccm Wasser durchgerührt; daraus sind Proben zu je 20 ccm abgenommen worden. Die Fällung wurde durch essigsaures Blei erzeugt, darauf wurde das Filtrat mit Kupferhydroxyd bearbeitet. Die Gärung dauerte 31 Stunden bei 32° C; dank der Abschwächung der fermentativen Tätigkeit hat sich während dieser Zeit nur 0,16 g Kohlensäure ausgeschieden, während die Hefe im vorhergehenden Versuch binnen desselben Zeitraumes den ganzen Zucker (6 g) vergoren hat. Die Gesamtmenge von Stickstoff in der Portion war 62,8 mg.

1. Kontrollportionen . . . . . 58,8 } 58,7 mg
2. Durch essigsaures Blei gefällt . 58,6 }
3. Zu 20 ccm 4 g Zucker hinzu- 51,7 } 51,5 mg
4. gefügt, 31 Stdn. bei 32° C . 51,4 }
5. 20 ccm Hefe ohne Zucker, 31 St. 49,4 } 49,3 mg
6. bei 32° C . . . . . 49,2 }

[1]) Nach 10 Stunden waren 3,7 g Zucker vergoren und nach 13 Stunden — 6 g.

In den Filtraten paralleler Portionen, welche vereinigt wurden, ist eine $Cu(OH)_2$Fällung erzeugt worden.

Es erwies sich Stickstoff in mg:

in Kontrollportionen 1—2 1,6
in Zuckerportionen 3—4 6,0

Unbeachtet dessen, daß die Gärung kaum zu bemerken war, fand in Gegenwart von Zucker eine Bildung von Verbindungen statt, welche keinen Eiweißcharakter besitzen und nach Stutzer niedergeschlagen werden. Daraus folgt, daß eine Anreicherung solcher Verbindungen mit dem Gärungsprozesse nicht verbunden ist, daß dieselbe vielmehr auf Rechnung einer freien Verbindung von Zucker mit Produkten des Eiweißzerfalles zu setzen ist. Aus diesem Versuch kann man sich abermals überzeugen, daß der Eiweißzerfall in Gegenwart von Zucker etwas niedriger ist, als in Wasserportionen.

In vorhergehenden Versuchen vollzog sich die Gärung ohne Antisepticum. Obzwar Mikroorganismen nicht entdeckt worden waren, benötigte man dennoch einen direkten Beweis dafür, daß der Zerfall von Eiweiß in Hefen nicht durch die Arbeit von Bakterien hervorgerufen wird, sondern durch die Tätigkeit der sich in Hefen befindenden Fermente. Ich habe zu Versuchsportionen Toluol hinzugefügt, um dergleichen Einwendungen zu entgehen. Außerdem gebrauchte ich im nächsten Versuch Hefe, welche ihre Gärfähigkeit dank der Zerstörung des Koferments fast vollständig verloren haben.

Versuch 6: Ca. 100 g lebender Hefe wurden nach 3tägiger Gärung von der Gärflüssigkeit abfiltriert, mit Wasser gewaschen und mit 200 ccm Wasser durchgerührt; daraus sind mit der Pipette Portionen von je 20 ccm abgenommen worden. Die Fällung wurde durch essigsaures Blei und darauf durch Kupferhydroxyd erzeugt. Zum Vergleich wurden Portionen mit und ohne Zucker, sowie mit und ohne Toluol angestellt.

1.	Kontrollportionen, je 20 ccm mit	68,7	68,6
2.	essigsaurem Blei niedergeschl. . .	68,5	

Nach Verlauf von 40 Stunden, bei 40° C erwies sich Eiweißstickstoff in Milligramm:

				Stickstoff-Zerfall in mg
3.	20 ccm Hefe	57,9	57,9	10,7
4.		57,9		
5.	20 ccm Hefe mit Toluol	59,4	59,4	9,2
6.		59,4		

7.	20 ccm Hefe m. 4 g Zucker	61,7	61,8	6,8
8.		61,8		
9.	20 ccm Hefe m. 4 g Zucker	62,4	62,3	6,3
10.	und Toluol	62,2		

Es wurde auch das Quantum der Kohlensäure bestimmt, welche sich während 40 Stunden bei 40° C aus der Zuckerportion (1) und aus der Zucker-Toluolportion ausgeschieden hat; dazu wurde die Gewichtsmethode angewandt und erwies sich CO_2

I. . . . . 0,05 g
II. . . . . 0,09 „

Sonach fand der Eiweißzerfall in denjenigen Portionen statt, zu welchen Zucker hinzugefügt worden war und zwar bei Ausbleiben der Gärung; Toluol hat dabei fast gar keine Wirkung ausgeübt, was als einwandfreier Beweis dafür gelten kann, daß der Zerfall des Hefeeiweißes unter den gegebenen Bedingungen nicht durch die Tätigkeit von Mikroorganismen erklärt werden kann.

Unbeachtet des Ausbleibens der Gärung fand in den Portionen von 7—10 eine Bildung stickstoffhaltiger Substanzen statt, welche nach Stutzer niedergeschlagen werden; so war das Quantum Stickstoff in Milligramm im $Cu(OH)_2$-Niederschlage, nach der Fällung mit essigsaurem Blei:

in Kontrollportionen . . . . . 2,0 mg
in den Zuckerportionen 7—8. . . . . 6,2 „
in den Zucker-Toluolportionen 9—10 . . . 7,0 „

Sonach darf die Bildung stickstoffhaltiger Substanzen, welche keinen Eiweißcharakter besitzen und nach Stutzer niedergeschlagen werden, nicht mit der Gärung in Verbindung gebracht werden.

Noch ein Versuch sollte aufklären, ob die Gärungsintensität zu der Stufe des Eiweißzerfalles in Beziehung steht. Es wurde der Zerfall von Eiweiß während der Gärung bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

Versuch 7: 90 g lebender Hefe wurden mit 550 g Wasser durchgerührt; mit der Pipette sind Portionen zu je 30 ccm abgenommen worden und zu jeder je 6 g Zucker hinzugefügt. In einigen Portionen vollzog sich die Gärung bei 32° C, in den anderen bei 16° C. Die ausgeschiedene Kohlensäure wurde gravimetrisch bestimmt. Ich hatte die Absicht, den Eiweißzerfall zu beobachten, nachdem bei verschiedenen Temperaturen (32° C und 16° C) ein gleiches Quantum Zucker vergoren worden war. Es stellte sich heraus, daß 4 g Zucker

bei 32° C nach 12 Stunden
abgebaut waren. „ 16° „ „ 40 „

Sollte der Eiweißzerfall mit der Gärungsintensität zusammenhängen, so müßten die zahlenmäßigen Angaben des Eiweißzerfalles gleich sein, wenn sich gleiche Zuckermengen zersetzt haben, gleichgiltig, ob bei 32° oder bei 16° C; die Versuchsresultate führten jedoch zu negativen Resultaten. Die Fällung der Portionen wurde mit $Cu(OH)_2$ ausgeführt, mit essigsaurem Blei und mit einer 5 proz. Lösung von Quecksilberchlorid. Der Stickstoff der betreffenden Niederschläge ist mit Cu, Pb und $HgCl_2$ bezeichnet und in mg ausgedrückt.

	Kontrollportionen		12 Stdn. bei 32° C		40 Stdn. bei 16° C	
Cu	79,0 78,7	78,8	77,5 77,7	77,6	78,2 78,4	78,3
Pb	— 80,9	80,9	74,2 74,2	74,2	78,8 79,0	78,9
$HgCl_2$	76,6 76,8	76,7	73,4 73,2	73,3	74,4 74,8	74,6

In den mit $Cu(OH)_2$ gefällten Portionen schien gar kein Eiweißzerfall stattzufinden, während sich bei der Fällung mit Pb und $HgCl_2$ in mg erwiesen hat:

	12 Stdn. bei 32° C	40 Stdn. bei 16° C
Pb	6,7	2,0
$HgCl_2$	3,4	2,1

Sonach zeigte sich, daß obzwar ein gleiches Quantum Zucker (4 g) vergoren worden war, der Eiweißzerfall in verschiedenen Portionen ganz verschieden stark war. Er ist nach 12 Stunden bei 32° höher als nach 40 Stunden bei 16° C; geht scheinbar unabhängig von der Gärung vor sich und wird vom Gärungsprozeß nicht verhindert.

Sonach findet sowohl der Zerfall des Hefeeiweißes, als auch die Anreicherung von stickstoffhaltigen Produkten, die nach Stutzer niedergeschlagen werden, unabhängig von der Gärung statt.

Substanzen, welche durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen werden, stellen Verbindungen von Zucker mit den Produkten des Eiweißzerfalles vor; zu ihrer Bildung hat die Anwesenheit von Hefen nur als Quelle stickstoffhaltiger Produkte Bedeutung, welche zur Synthese mit Zucker notwendig sind. Diese Substanzen gehören zum Typus der Verbindungen, welche von Maillard als Huminprodukte bezeichnet wurden; diese Bezeichnung soll eine ganze Gruppe von Substanzen vereinigen, welche miteinander in

genetischem Zusammenhange stehen; diejenigen Produkte der Synthese von Zucker mit Aminosäuren, welche von **Maillard** beschrieben sind, stellen das endgültige Stadium der Verwandlung dieser Produkte dar, doch entstehen im Verlaufe ihrer Bildung Zwischenverbindungen, in denen die NH_2-Gruppe der Aminosäure schon gebunden ist, während sich die schwarze, geleeartige, schlecht in Wasser lösliche Masse, noch nicht gebildet hat. Solche Zwischenstadien werden auch oft durch gegenseitige Wirkung von schwacher Glykoselösungen einerseits und von Aminosäuren oder Ammoniumsalzen andererseits erhalten; die Anwesenheit von Hefen schafft nur die günstigste Bedingung für eine solche Bindung. Hier will ich noch Versuche über die Einwirkung von ziemlich schwachen Lösungen stickstoffhaltiger Verbindungen mit der Glykose anführen; diese Reaktion nimmt eine längere Zeit in Anspruch; ich habe die Absicht zu zeigen, daß diese Synthesen auch in den Versuchsbedingungen früherer Verfasser verlaufen konnten.

Versuch 8: Zu je 100 ccm 20- und 30 proz. Glykoselösungen wurde eine Lösung von schwefelsaurem Ammonium mit 257,8 mg Ammoniumstickstoff hinzugefügt. Nach erfolgter Sterilisation wurden Kontrollportionen I und II sofort mit Kupferhydroxyd gefällt, Portionen III und IV nach 30tägigem Aufenthalt im Thermostat bei 30° C und Portionen V und VI nach 100 Tagen. Im Resultat wurden folgende Mengen Stickstoff im $Cu(OH)_2$-Niederschlage in Milligramm erhalten:

	20 proz. Glykose	30 proz. Glykose
I und II . . .	Spuren	Spuren
III und IV . . .	9,6	15,1
V und VI . . .	15,5	21,5

Während der Zeit der gegenseitigen Einwirkung der 20- und 30 proz. Glykoselösung und des schwefelsauren Ammoniums haben sich schon merkbare Quanten stickstoffhaltiger Verbindungen gebildet, die nach **Stutzer** niedergeschlagen werden. Diese Erscheinung kann einer Absorption von Ammonium durch Kupferhydroxyd nicht zugeschrieben werden, weil die Waschung der Niederschläge mit destilliertem Wasser bis zum Verschwinden der Ammoniakreaktion mit **Nesslerscher** Reagenz fortgeführt wurde. Die freie Verbindung von Ammoniak mit Zucker bei Thermostat-Temperatur erklärt vollständig die Resultate der Arbeiten von **Duclaux** und **Pringsheim**, welche eine große Bindung von Ammoniakstickstoff in einer Umgebung erhielten, in der Hefe sich

entwickelt und gegoren hat. Pringsheim rechnete diese Bindung von Ammoniak zu dessen Verbrauch durch Hefe hinzu, obzwar das in Hefen angereicherte Quantum von Stickstoff einige Mal niedriger war, als das Quantum des „verbrauchten" Stickstoffs. Von diesem Standpunkte aus erscheint der Hinweis Pringsheims verständlich, daß sich der „Verbrauch" von Ammoniak mit der Erhöhung der NH_4-Ionen Konzentration erhöht, daß jedoch dieser Verbrauch der Anreicherung von Stickstoff in Hefen nicht proportional ist, und daß überhaupt kein Zusammenhang besteht zwischen dem „Verbrauch" von Ammoniak und der Gärung während des Wachstums der Hefe. Die Erhöhung der Konzentration sowohl der Glykose, als auch der NH_4-Ionen beschleunigt den Prozeß der Bildung stickstoffhaltiger Huminverbindungen. Sonach muß man im Falle einer gleichzeitigen Anwesenheit von Glykose und Ammoniak oder Aminosäuren im Auge behalten, daß die Verminderung dieser beiden in Lösung befindlichen Komponenten nicht immer dadurch erklärt werden kann, daß sie von den Hefen verbraucht worden sind; eine freie Verbindung dieser Substanzen miteinander ist ja besonders bei langdauernder Einwirkung möglich. Für solche Synthesen sind jene hohe Konzentrationen der Glykose nicht nötig, von denen Maillard spricht, die Reaktion verläuft auch bei einer Konzentration unter 10%.

Der nächste Versuch zeigt, daß bei der Erhitzung von Ammoniumsalz mit Glykose in alkalischer Lösung eine Bindung von Ammoniakstickstoff und die Bildung huminöser Substanzen stattfindet.

Versuch 9: Zur Destillation mit Alkali wurde 5 ccm einer 15 proz. $(NH_4)_2SO_4$-Lösung genommen, welche mit 50 ccm Wasser verdünnt waren; eine Portion (I) wurde mit NaOH ohne Hinzufügung von Zucker destilliert, zu einer anderen (II) wurde vor der Destillation 7,5 g Glykose hinzugefügt; im Destillat wurde Ammoniakstickstoff in Milligramm erhalten:

I	156,0
II	148,4

In Gegenwart von Glykose ließen sich 7,6 mg (156,0—148,4) nicht abdestillieren; die Glykoseportion wurde während der Destillation stark braun; als sie nach Abkühlung durch Schwefelsäure neutralisiert wurde, fiel ein schwarzer Niederschlag einer huminösen Substanz aus; dieser Niederschlag wurde sorgfältig mit Wasser gewaschen, darauf getrocknet und nach Kjeldahl verbrannt; er enthielt:

2,2 mg Stickstoff.

Das Quantum Stickstoff im schwarzen huminösen unlöslichen Rückstande erwies sich kleiner, als das Quantum des nicht abdestillierten Ammoniaks; daraus folgt, daß sich bei Beginn der Bindung von Ammoniak mit der Glykose lösliche Verbindungen bilden, die erste später in den Niederschlag übergehen[1]).

Ich habe öfters Fälle der Bindung von Aminosäuren mit Glykose ohne jeglichen Einfluß von Hefen beobachten können, wobei diese Synthesen in verhältnismäßig schwachen Konzentrationen der Glykose stattfanden. Sonach ist die Bildung huminöser Substanzen während der Hefegärung bei Anwesenheit von Zucker und Aminosäuren stets möglich.

Jetzt müssen wir uns der Frage zuwenden, welche physiologische Rolle die stickstoffhaltigen Verbindungen spielen, die sich während der Gärung, und doch vollständig unabhängig von ihr, bilden. Ist ihre Entstehung nicht mit denjenigen, sogenannten stickstoffhaltigen Exkrementen, zu verknüpfen, von denen Ad. Mayer spricht? Der genannte Verfasser hatte gezeigt, daß sich während der Gärung stickstoffhaltige Substanzen bilden, welche nicht als Stickstoffquelle zur Entwicklung der Hefe dienen können. Nach der Gesamtmenge des in denselben enthaltenen Stickstoffes (5,7%), und nach der Beschreibung ihrer anderen Eigenschaften ähneln diese Substanzen den nach Maillards Verfahren erhältlichen huminösen Verbindungen. Ich habe nach Maillard huminöse Substanzen bereitet und untersuchte in denselben das in ihnen enthaltene Quantum freier NH_2-Gruppen, die Verdaulichkeit dieser Verbindungen durch Hefefermente und durch Taka-Diastase, und ihre Fähigkeit als Stickstoffquelle bei der Entwicklung der Hefe zu dienen.

Versuch 10: 1,5 g Glykokoll wurden mit 6 g Glykose und 6 ccm Wasser im Kolben auf dem Wasserbade während 30 Stunden erhitzt. Der nach dem Abkühlen gebildete geringe schwarze Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat verdampft, bis zum beständigen Gewicht bei 110° C getrocknet und pulverisiert. Dieses in Wasser lösliche schwarze Pulver gab bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 5,46% Stickstoff,

I. 0,3929 g Substanz gaben 21,45 mg N,

II. 0,5487 g Substanz wurden auf den Inhalt freier NH_2-Gruppen nach van Slyke untersucht; es wurde 2,17 mg erhalten, d. h. daß nur 0,4% NH_2-Stickstoff auf das Trockengewicht berechnet vorhanden war;

[1]) Möglich ist, daß ein Teil des Stickstoffs mit dem Waschwasser fortgespült worden ist.

III. 0,4494 g des schwarzen Pulvers wurden in 10 ccm Wasser gelöst, dazu 0,1 g Taka-Diastase hinzugefügt und 20 Stunden bei 40° C aufbewahrt.

Ich hatte die Absicht zu versuchen, die Bindung der NH_2-Gruppen vermittelst des proteolytischen Fermentes der Taka-Diastase zu zersetzen. Bei der Stickstoffbestimmung nach van Slyke wurde 2,0 mg Stickstoff d. h. 0,44% dem Gewichte nach, erhalten. Also hat sich das Quantum der NH_2-Gruppen mit der II. Kontrollportion verglichen, trotz der Verdauung nicht vergrößert; sonach sind Verbindungen des Stickstoffs in huminösen Substanzen durch Einwirkung des proteolytischen Fermentes der Taka-Diastase nicht angegriffen worden.

Um mich zu überzeugen, daß Hefefermente auch nicht fähig sind, huminöse Substanzen zu zersetzen und die in ihnen enthaltenen freien Aminogruppen zu befreien, habe ich einen Versuch gemacht, in dem die nach Maillard bereitete huminöse Substanz zu Hefeportionen hinzugefügt wurde, welche der Autolyse unterworfen waren, in denen also, wie aus dem Versuch ersichtlich, Peptase anwesend war.

Versuch 11: 4 Portionen Zymin, zu je ca. 0,5 g, wurden mit 10 ccm Wasser autolysiert.

Nach 3tägigem Aufenthalt im Thermostat bei 32° C mit Toluol wurde in der ersten Portion Stickstoff nach van Slyke bestimmt, während die 2. bis 4. Portion noch auf 24 Stunden bei 32° C gelassen worden sind, wobei zu der 4. Portion 0,1 g verkäuflichen Peptons hinzugefügt wurde und zu der 3. 0,2 g einer huminösen Substanz[1]).

Das Quantum von Eiweißstickstoff in den 4 Portionen wechselte von 36,6 mg bis 44,9 mg; alle Berechnungen sind auf eine Portion von 50 mg Stickstoff gemacht worden.

	N nach van Slyke in mg	N-Erhöhung nach van Slyke in mg
1. Autolyse 72 Stdn. bei 32° C . . .	24,6	0
2. desgl., jedoch weitere 24 Stdn. bei 32° C	27,8	3,2
3. Autolyse 72 Stdn. bei 32° C, darauf 0,2 g humin. Substanz hinzugefügt und weitere 24 Stdn. bei 32° C .	28,6	4,0
4. desgl., jedoch anstatt huminöser Substanz 0,1 g Pepton hinzugefügt	33,2	8,6

Nach 72stündiger Autolyse dauerte die Arbeit der Peptase fort, was aus der zweiten Portion ersichtlich ist, welche weitere

[1]) Die huminöse Substanz wurde durch Erwärmung auf dem Wasserbade von 1 g Glykokoll mit 4 g Glykose und 10 ccm Wasser erhalten. Nach der Fällung mit $Cu(OH)_2$ wurde aus dem Niederschlage eine schwarz gefärbte Substanz ausgeschieden, die sich schon schwerer in Wasser löste als vorher.

24 Stunden bei 32° C gelassen wurde, und aus der vierten, wo Pepton hinzugefügt wurde; dagegen erhöhte die dritte Portion, in welche die huminöse Substanz eingeführt worden war; ihren Stickstoff nach van Slyke nicht. Sonach vermag das proteolytische Hefeferment NH_2-Gruppen in der huminösen Substanz nicht frei zu machen.

Versuch 12: 4 Portionen trockener Hefe, zu je ca. 0,6 g, wurden mit 10 ccm Wasser und Toluol auf Autolyse gestellt. Das Quantum von Eiweißstickstoff wurde zu 100 mg angenommen. Nach 3 Tagen bei 32° C wurde Stickstoff in Milligramm nach van Slyke bestimmt:

1. Kontrollportion . . . . . 57,2 mg
2. 3 Tage bei 32° C, darauf weitere 20 Stdn. bei 32° und vor der Bestimmung 0,25 g huminöser Substanz hinzugefügt . . . . 62,2 „
3. 3 Tage bei 32° C, darauf 0,25 g huminöser Substanz, 13,2 mg Stickstoff enthaltend, hinzugefügt und weitere 20 Stdn. bei 32° C . . . . . 62,0 „
4. desgl., doch vor der 20stündigen Autolyse 0,1 g Pepton hinzugefügt . . . . . 67,0 „

Die Resultate dieses Versuches zeigen ganz eindeutig, daß Hefepeptase nicht fähig ist Stickstoffbindungen huminöser Substanzen aufzulösen. Sonach müssen wir erwarten, daß huminöse Substanzen nicht als Stickstoffquelle für Hefe dienen können, ein neuer Beweis für die Identität der huminösen Substanzen mit den stickstoffhaltigen Hefeexkrementen, welche nach Ad. Mayers Angaben ebenfalls nicht zur Entwicklung der Hefe dienen können, unbeachtet der großen Menge des darin enthaltenen Stickstoffs.

In den zwei nächsten Versuchen habe ich die Entwicklung der Reinkultur lebenden Hefe (Saccharomyces cerevisiae) in einer Nährsalzlösung verglichen, zu der als Stickstoffquelle entweder Glykokoll oder dasjenige Quantum huminöser Substanz hinzugefügt worden war, welches aus dem gegebenen Quantum Glykokoll erhalten wurde; unbeachtet der gleichen Mengen Stickstoffs in diesen beiden Verbindungen, erwiesen sich die Resultate scharf verschieden. Den Grad der Hefeentwicklung habe ich nach der Menge der ausgeschiedenen Kohlensäure beurteilt. Die Kolben waren mit Korkstöpseln verschlossen, welche vor dem Schließen der Kolben mit sterilisierter Lösung durch die Flamme geführt wurden; die Stöpsel sind mit Meissl-Ventile mit Bunsen-Verschlüssen versehen worden. Die Kohlensäure wurde nach der Gewichtsmethode bestimmt.

Versuch 13: Es wurde eine Nährlösung folgender Zusammensetzung bereitet:

25 g Saccharose
0,25 g KH_2PO_4
0,1 „ $MgSO_4$
Spuren $FeSO_4$
in 250 ccm Wasser.

Aus der Lösung wurden Portionen zu je 40 ccm abgenommen.

1. Ohne Hinzufügung stickstoffhaltiger Substanzen;
2. 0,03 g huminöser Substanz hinzugefügt;
3. 0,01 g Glykokoll hinzugefügt.

In der 2. und 3. Portion waren die Quantitäten Stickstoffs gleich, 1,8 mg.

Alle Portionen wurden nach 3maliger Sterilisation im Koch schen Dampftopf mit minimalen Quanten Hefe beäät und, nachdem Wattestöpsel durch Korkstöpsel mit Meissls Ventilen und Bunsens Verschlüssen ersetzt waren, in den Thermostaten bei 30° C gestellt.

Ausgeschiedene Kohlensäure in Milligramm:

Tage	1. ohne N	2. N-humin. Subst.	3. N-Glykokoll
3	47	47	70
6	96	109	405
9	147	160	775
12	203	214	1000
14	231	240	1093

Die Kohlensäureentwicklung in der ersten, stickstoffreien Portion und in der zweiten, welche Stickstoff in Form huminöser Substanzen enthielt, ist praktisch gleich; der Stickstoff huminöser Substanzen ist von den Hefen nicht aufgenommen worden, was auch nach den Resultaten vorhergehender Versuche zu erwarten war, denn diese zeigten, daß das proteolytische Hefeferment nicht imstande ist, diese Verbindungen zu spalten. Wegen der Wichtigkeit dieses Versuches für meine Schlußfolgerungen wurde er wiederholt.

Versuch 14: Nährlösung und Bedingungen wie im vorhergehenden Versuch.

Tage	1. ohne N	2. N-humin. Subst.	3. N-Glykokoll
3	59	60	40
5	105	115	164
7	139	145	457
9	169	175	695
12	211	220	980
15	251	260	1205
18	281	290	1350

Hier ist eine vollständige Bestätigung des vorhergehenden Versuches vorhanden; huminöse Substanzen erwiesen sich unfähig, ihren Stickstoff den wachsenden Hefen zu übergeben.

Man erinnere sich der Versuche Ad. Mayers, der die Beobachtung machte, daß die stickstoffhaltige Substanz aus dem Extrakt gegorener Hefe eine viel schlechtere Stickstoffquelle vorstellt, als der Auszug aus frischen Hefen, wenn auch die Gesamtmenge Stickstoff im letzten Fall viel kleiner war; sonach enthält der Extrakt gegorener Hefe irgendwelche besondere, unbekannte stickstoffhaltige Substanzen, welche von der Hefe nicht assimiliert werden können. Die Beschreibung dieser Substanzen von Ad. Mayer — braune Farbe, Karamellgeruch, 5,7% Stickstoff — stimmt mit den Kennzeichen huminöser Substanzen überein. Meine Versuche über die Unverdaulichkeit dieser Substanzen für Hefen während ihrer Entwicklung stimmen damit überein, was Ad. Mayer bei Substanzen beobachtete, welche nach der Hefegärung erhalten werden. Da wir, nach Maillard, als huminöse Substanzen eine ganze Gruppe von Verbindungeu bezeichnen, welche sich auf dem Wege freier Synthese von Aminosäuren mit Glykose bilden, so erscheint es nicht möglich, stickstoffhaltige „Gärungsexkremente" mit den huminösen Substanzen zu identifizieren, doch stimmen ihre sämtlichen bekannten Kennzeichen überein; außer den von mir angedeuteten muß man die Fällbarkeit sowohl der einen, als auch der anderen durch Kupferhydroxyd beachten. Es ist mir einige Male gelungen, aus dem Extrakt gegorener Hefe eine stickstoffhaltige Verbindung von dunkler Farbe zu erhalten, welche allen Kennzeichen nach mit der Beschreibung huminöser Substanzen übereinstimmt; die Substanz wurde durch $Cu(OH)_2$ niedergeschlagen, doch enthielt sie eine Beimengung von Salzen, weswegen das Stickstoffquantum etwas zu niedrig ausfiel (bis 5%). Ist es auch schwer, auf Grund bestimmter chemischer Kennzeichen huminöse Substanzen mit den sich während der Gärung bildenden stickstoffhaltigen „Exkrementen" zu identifizieren, so haben wir doch sichtbare Beweise, welche auf ihre gemeinschaftliche Eigenschaft, von Hefen während der Entwicklung nicht assimiliert zu werden, hinweisen. Dieses physiologische Kennzeichen besitzt eine nicht mindere Beweisfähigkeit für ihre Identifizierung als die oben beschriebenen allgemeinen Eigenschaften.

Ich habe die Nährkraft der huminösen Substanzen untersucht, indem ich mich des Pilzes Aspergillus niger bediente.

Versuch 15: 300 ccm Nährlösung enthielten:

0,3 g	KH_2PO_4
0,3 g	$MgSO_4$
15 g	Saccharose
Spuren	$FeSO_4$
Spuren	$ZnSO_4$.

Es wurden 3 Portionen Lösung zu je 100 ccm abgenommen:

1. Ohne Zusatz stickstoffhaltiger Nahrung;
2. 0,3 g Glykokoll hinzugesetzt;
3. 1 g huminöser Substanz, wie oben beschrieben erhalten, hinzugesetzt.

Nach der Sterilisation wurden die Kolben mit Sporen von Aspergillus niger besät. Nachdem 4 Tage bei 30° kultiviert war, hat sich in den Kolben ein scharfer Unterschied bemerkbar gemacht; der Versuch wurde unterbrochen, das Mycel abfiltriert, bis zum konstanten Gewicht bei 105° C getrocknet und darin das Quantum des angereicherten Stickstoffs bestimmt. Das Quantum des hinzugesetzten Stickstoffs war in der 2. und der 3. Portion gleich.

Die Ergebnisse waren folgende:

1. Die Portion enthielt nur unbedeutende Mengen von Pilzflocken; sowohl das Trockengewicht, als auch das Stickstoffquantum wurden nicht bestimmt.

2. Die Portion enthielt eine dicke Haut, welche nach Auswaschen mit Wasser bis zum konstanten Gewicht getrocknet wurde; das Gewicht des Mycels 1,9052 g. Das Mycel enthielt 35,2 mg Stickstoff.

3. Die Portion hatte ein dünnes Häutchen von Mycel, welche 0,3164 g Trockengewicht gab und 3,8 mg Stickstoff enthielt.

Die letzte Portion enthielt vor dem Versuch 54,6 mg huminösen Stickstoffs; von diesem Quantum reagierten nach van Slyke nur 3,93 mg. Im Mycel hat sich 3,8 mg vorgefunden. Daraus ist zu ersehen, daß die huminöse Substanz gar nicht als Stickstoffquelle für den Aspergillus dienen kann; eine einzige Stickstoffanreicherung — 3,8 mg im Mycel kann durch die unvollständige Bindung der NH_2-Gruppen in der huminösen Substanz erklärt werden; denn ein Kontrollversuch hat gezeigt, daß in 1 g huminöser Substanz 3,93 mg Stickstoff enthalten ist, der nach van Slyke reagiert.

Im allgemeinen ist es bekannt, daß Aspergillus nur mit großer Mühe den Stickstoff solcher cyclischer Verbindungen, wie Pyridin

u. a. verwertet, in diesem Sinne liegen sichere Angaben von Czapek[1]) vor. Nach Maillard stellen huminöse Substanzen komplizierte Verbindungen cyclischen Typus vor. Es ist daher verständlich, daß sie auch von Schimmelpilzen kaum assimiliert werden.

Als ich an Hand literarischer Quellen verfolgte, ob man nicht in Hefen Substanzen vorgefunden hat, welche jetzt, nach Maillard, als huminöse bezeichnet werden, so bin ich auf eine Arbeit Salkowskis[2]) über das Hefeinvertin gestoßen. Der Verfasser erhielt Invertinpräparate im Gemisch mit Gummi, da sich deren Zusammensetzung stark voneinander unterschied. Manchmal wurden Präparate erhalten, welche sich auch in kochendem Wasser schlecht lösten, doch vollzog sich die Lösung leicht in einer schwachen Lösung von Ätznatron; in diesem Falle hat ein Zusatz von Essigsäure einen Niederschlag hervorgerufen. Präparate dieser Art enthielten eine Beimischung von Gummi und Eiweiß. Ihr Stickstoffgehalt schwankte nämlich von 5,95—8,4%. Der Gehalt an Stickstoff in einem unbestimmten Verhältnis, die Löslichkeit im schwachen Alkali und das Ausfallen aus dieser Lösung nach Zusatz von Säure weisen daraufhin, daß es der Verfasser offenbar auch mit huminösen Substanzen zu tun hatte, welche vielleicht nur durch Zusätze verunreinigt waren.

Heutzutage müssen wir anerkennen, daß während der Gärung in Hefen ein Zerfall des Eiweißes stattfindet. Die Angaben von Thénard, Pasteur, Liebig u. a. haben sich als vollständig richtig erwiesen; die von L. Iwanoff auf Grund der Stutzer-Methode gezogenen Schlußfolgerungen über die gänzliche Unzersetzlichkeit der Eiweißstoffe während der Gärung müssen durch die Ungenauigkeiten der Methode erklärt werden, da sich herausgestellt hat, daß das Kupferhydroxyd nicht nur Eiweißstoffe, sondern auch die während der Gärung gebildeten huminösen Substanzen niederschlägt.

Erkennen wir den Zerfall des Eiweißes während der Gärung an, so müssen wir zugeben, daß wir die gegenseitigen Beziehungen dieser beiden Prozesse noch nicht verstehen. Die Pflüger-Dettmersche Theorie, daß Eiweißstoffe beim Zerfall Material zur Atmung und Gärung liefern, wird jetzt völlig verstoßen, weil dieselbe gar keine experimentelle Basis besitzt. Doch sind in der Literatur Andeutungen darauf vorhanden, daß die Ausscheidung stickstoffhaltiger Substanzen aus Hefen mit dem Austritt der sich außerhalb der Zellen befindenden Enzyme verknüpft sein könnte.

[1]) F. Czapek, Ber. d. Dtsch. Botan. Ges. **19**, 130. 1901.

[2]) E. Salkowski, Zeitschr. f. phys. Chem. **31**, 305. 1900—1901.

Liebig vermutete, daß die stickstoffhaltigen Teile der Zelle, welche molekulare Bewegungen ausführen, in die gärende Flüssigkeit übergehen und die fermentativen Prozesse der Inversion und Zuckervergärung hervorrufen. Nägeli[1]) meinte, daß Hefe während der energischen Gärung eine fibrinartige Masse von Pepton und Albumosen in die Flüssigkeit ausscheidet. Bei normalem Zustande der Hefezelle diffundiert aus ihr kein Eiweiß durch die Membran, weil die Eiweißmicellen mit einander verbunden sind; nach Nägeli findet im Gärungsprozesse eine Isolierung der Micellen voneinander statt, welche ihren Austritt aus der Zelle zur Folge hat. Plasmapartikelchen der Hefezellen, die molekulare Bewegungen ausführen, rufen die Gärung des Zuckers hervor.

Im Falle von Nahrungsmangel gab Rubner auch die Möglichkeit zu, daß sich äußere und innere Fermente auf Kosten derjenigen Verbindungen bilden, welche für das Leben notwendig sind; dies ist nach Rubner ein Fall der „inneren" Ausnutzung der lebenden Substanz durch Hefe. Im allgemeinen wird jedoch der Eiweißzerfall in Hefen unzertrennlich mit dem Leben verknüpft und in Analogie mit den Abnützungsvorgängen der tierischen Zelle zu stellen sein. Rubner meinte, daß der Stickstoffverlust gesetzmäßig von Tag zu Tag stattfindet und sich bei wiederholtem Zusatz von Zucker in demselben Maße vermindert, als sich die Gärungsfähigkeit abschwächt. Doch griff er in seinen parallelen Bestimmungen des Eiweißzerfalles und der Gärungsenergie zu einem so unvollkommenen Verfahren, daß man seine Schlußfolgerungen nicht anerkennen kann. Nach 24stündiger Gärung von 5 g Hefe in 10proz. Saccharose zentrifugierte der Verfasser die Hefe; goß die Flüssigkeit ab, setzte nochmals eine Zuckerlösung hinzu, ließ gären, zentrifugierte wieder usw. bis 6mal.

Unter diesen Verhältnissen beobachtete Rubner die Stickstoffverarmung der Hefe und die Abschwächung des Gärungsprozesses; dabei schwächte sich die Gärungskraft viel rascher ab, als der Stickstoff abnahm. Rubners Zusammenhang zwischen Gärung und Eiweißzerfall ist deshalb nicht überzeugend, weil er nicht in Betracht gezogen hat, daß jedes Zentrifugieren und Abgießen der Gärungsflüssigkeit einen Teil des Koenzym mitgenommen hat; die Abschwächung der Gärungsenergie kann durch diese Maßnahme und nicht durch die Stickstoffabnahme bewirkt

[1]) C. Nägeli, Theorie der Gärung, 1879.

werden. Rubner hat überhaupt in seinen Schlußfolgerungen das Koferment der Gärung nicht in Rechnung gesetzt, worauf Buchner richtig hingewiesen hat. Vielleicht existieren auch Beziehungen zwischen der Gärung und dem Eiweißzerfall, doch sind dieselben nicht als bewiesen zu betrachten, umsomehr als Rubners Schlußfolgerungen auf der Stickstoffabnahme in Hefen, nicht aber auf dem Eiweißzerfall in den Hefezellen basieren; dies darf nicht verwechselt werden. Denn es ist denkbar, daß sich auch unverändertes Eiweiß aus der Hefe ohne jegliche Spaltung derselben ausscheiden kann. Rubner hatte beide Prozesse nur in dem Falle identifizieren dürfen, wenn er das gänzliche Fehlen von Eiweißstoffen in der abzentrifugierten Flüssigkeit nachgewiesen hätte.

Sonach kann man heutzutage nicht daran zweifeln, daß die Hefe während der Gärung ihren Stickstoff verliert und in ihr ein Eiweißzerfall stattfindet; wenn uns der Zusammenhang dieses Prozesses mit der Gärung auch noch nicht klar ist, so ist jedenfalls offenbar, daß die Gärung ihn nicht zu verhindern vermag.

Was nun die stickstoffhaltigen Verbindungen anbelangt, welche sich bei der Gärung aus dem zerfallenden Eiweiß bilden, so existieren über ihre Natur, wie ich schon oben erwähnt habe, sehr ungewisse Angaben: Rubner unterscheidet sie scharf von denjenigen Produkten des Eiweißzerfalles, welche bei der Hefeautolyse erhaltn werden, doch bleibt für ihn die chemische Natur dieser Verbindungen unbestimmt; nur ist er geneigt, diesen Substanzen die Rolle der stickstoffhaltigen Exkremente zuzuerkennen, d. h. die Rolle solcher Verbindungen, welche nach Mayer nicht mehr als Stickstoffquelle für Hefe dienen können. Bedeutend früher als Rubner beobachtete Nägeli die Erscheinung in der Gärflüssigkeit während der Gärung einer fibrinähnlichen Masse, welche er für Pepton und Albumosen hielt; diese Substanzen fielen nach Nägeli und Hayduck durch Phosphorwolframsäure, doch darf man sie nicht als Peptone ansprechen, weil viele stickstoffhaltige Verbindungen, darunter auch huminöse Substanzen, durch dieses Reagens niedergeschlagen werden; außerdem bleibt in der Gärflüssigkeit meist die Biuretreaktion aus; was auch auf die Unmöglichkeit hinweist, den Grundsatz Nägelis über die Ausscheidung von Peptonen aus der Hefezelle während der Gärung anzuerkennen.

Meine Versuche führen mich zu der Überzeugung, daß diejenigen stickstoffhaltigen Substanzen, welche während der Gärung auftreten, nicht an die Gärung gebunden sind, sondern als Resultat der freien Synthese von Glykose einerseits und von Ammoniak, Aminosäuren oder Peptonen andererseits entstehen. Sämtliche Beobachtungen früherer Verfasser stimmen vollständig darin überein, daß die Erscheinung in der gärenden Flüssigkeit derjenigen stickstoffhaltigen Verbindungen, welche mit dem Gärungsprozeß verbunden sind, nur dann in bedeutenden Mengen Platz greift, wenn eine hohe Konzentration von Glykose und Aminosäuren oder Ammoniak vorhanden ist. Lintner[1]) bemerkte, daß bei der Entwicklung und Gärung der Hefe auf Asparagin stickstoffhaltige Substanzen, die er als Hefeexkremente betrachtete, nur in dem Falle erhalten werden, wenn die Zuckerkonzentration bis zu 20% heraufgeht und die Menge der gesähten Hefe sehr bedeutend ist.

Pringsheim beobachtete in der obenerwähnten Arbeit, daß das Quantum des von Hefen „verbrauchten" Stickstoffs, d. h. eines solchen, der sich am Ende des Versuchs nicht mehr charakterisieren läßt, nicht von dem wirklich in Hefen vorgefundenen Stickstoff abhängig ist, sondern von der Konzentration des zur Kultur zugesetzten schwefelsauren Ammoniums. Von meinem Standpunkte aus finden diese Tatsachen eine einfache Erklärung, denn je konzentrierter die Lösung der Glykose und stickstoffhaltiger Substanzen in der Kultur ist, desto mehr huminöser Verbindungen werden sich dort anreichern; diese huminösen Substanzen wurden eben von den Verfassern entweder für den von Hefen „verbrauchten" Stickstoff (Pringsheim) oder für Pepton (Nägeli) oder für stickstoffhaltige Gärungsexkremente (Ad. Mayer) gehalten. Die stickstoffhaltigen Substanzen, welche in der gärenden Lösung erhalten werden, tragen sämtliche Kennzeichen huminöser Substanzen, so z. B. die braune Farbe, den Geruch gebrannten Zuckers, den Stickstoffgehalt von 5—6%, die Fällbarkeit durch Kupferhydroxyd und durch Phosphorwolframsäure; ferner sollte man auf die vollständige Unfähigkeit beiderlei Verbindungen, als Stickstoffquelle für wachsende Hefe zu dienen, als ihr allgemeines physiologisches Kennzeichen das größte Gewicht legen. Meine Versuche, in denen eine Bindung von Ammoniak und Aminosäuren mit Zucker in verhältnismäßig schwachen Lösungen und in Abwesenheit von Hefen stattfand, ermöglichen, die Entstehung von Substanzen zu erklären, welche Ad. Mayer als Gärungsexkremente ansah.

Die freie Bindung von Zucker mit stickstoffhaltigen Substanzen findet offenbar auch in technischen Betrieben statt, z. B.

---

[1]) Lintner, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. 798. 1899.

in der Bierbrauerei. Das Studium der bei der Aufbewahrung von Zucker und stickstoffhaltiger Verbindungen entstehenden Substanzen kann daher auch praktische Bedeutung erlangen. Doch soll man sich dabei stets dessen erinnern, daß die erhaltenen Abfallstoffe keine Gärungsexkremente, sondern Produkte freier Synthese von Zucker mit stickstoffhaltigen Verbindungen vorstellen.

Schlußfolgerungen.

1. Während der Gärung in Zucker findet Eiweißzerfall statt.

2. Frühere Angaben über die Beständigkeit des Eiweißes während dieses Prozesses sind auf die Unvollkommenheit der Eiweißbestimmungsmethoden nach Stutzer zurückzuführen.

3. Während der Gärung, doch unabhängig von derselben, findet eine Anreicherung stickstoffhaltiger Produkte statt, welche jedoch keinen Eiweißcharakter besitzen und durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen werden; dadurch wird der Eiweißzerfall maskiert, wenn man denselben nach Stutzers Methode berechnet.

4. Die während der Gärung gebildeten stickstoffhaltigen Nichteiweißsubstanzen ihren Eigenschaften und ihrer Bildung nach den huminösen Verbindungen nahe verwandt.

5. Huminartige Substanzen werden durch die proteolytischen Hefefermente nicht gespalten, weshalb sie nicht als stickstoffhaltiges Nahrungsmaterial bei der Hefeentwicklung dienen können.

6. Ad. Mayers „Gärungsexkremente" sind Verbindungen von huminösem Typus; sie bilden sich auf dem Wege freier Vereinigung der stickstoffhaltigen Hefesubstanzen mit Zucker; die Bildung der „Gärungsexkremente" ist nicht mit der Gärung kausal verknüpft.

Über den Einfluß der Gärungsprodukte auf den Zerfall der Eiweißstoffe in den Hefen.

Von

Nicolaus N. Iwanoff.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Petersburg.)

(Eingegangen am 23. April 1921.)

In der umfangreichen Literatur über den Einfluß verschiedener Substanzen auf den Eiweißzerfall in Hefen wird ein bedeutender Platz dem Studium der Gärungsprodukte eingeräumt. Die hemmende Wirkung von Spiritus und Zucker und die stimulierende von schwachen Säurekonzentrationen sind gut bekannt. Besondere Bedeutung wird den Gärungsprodukten zugeschrieben, seitdem die Ansicht aufgekommen ist, daß Hefeeiweißstoffe während der Gärung nicht zerfallen, L. Iwanoff[1]) nach besonderen antiproteolytischen Substanzen zu suchen begonnen hatte, welche sich während der Gärung ausscheiden und eine Verhinderung des Eiweißzerfalls hervorrufen sollten. Eine solche Substanz sollte nach des Verfassers Meinung im Aldehyd vorliegen. L. Iwanoffs Schlußfolgerungen beruhten auf Versuchen, welche so lange keinen Zweifel hervorgerufen hatten, wie der Grundsatz über die Beständigkeit der Eiweißstoffe während der Gärung feststand. Nachdem man auf Grund von Angaben, welche im vorhergehenden Aufsatz dargestellt worden sind, hatte zugeben müssen, daß die Gärung den Zerfall des Eiweißes nicht unterbindet, erschien es notwendig, die Angaben über die hindernde Rolle der Gärungsprodukte beim Eiweißzerfall, insbesondere die Rolle des Acetaldehyds, zu revidieren.

L. Iwanoff stellte fest, daß Eiweißstoffe der gegorenen Hefe schwerer zerfallen als der nichtgegorenen. So vergleicht er z. B. (l. c. S. 121) den Zerfall des Hefeeiweißes nach 24stündiger Gärung mit dem Zerfall desselben in Portionen nichtgegorener Hefe, welche mit Wasser durchgerührt worden

[1]) L. Iwanoff, St. Petersburg 1905.

waren. Die im Thermostat bei 50° C durch einen Überschuß von Thymol getöteten Portionen sowohl der einen als auch der anderen Hefe gaben nach 64 Stunden Autolyse bei 47° C folgende Mengen an zerfallenem Eiweiß: Gegorene Hefe 61,4%, nichtgegorene 80,0%. Die gegorenen Hefen wurden mit den Gärungsprodukten und dem rückständigen Zucker zusammen autolysiert. Deshalb meint L. Iwanoff, daß sich bei der Gärung eine besondere Substanz bildet, welche den den Eiweißzerfall verhindernden Antienzymen an die Seite zu stellen ist; diese Ansicht beweist der Verfasser durch folgenden Versuch. Er autolysiert Hefe: 1. Gegorene, 2. nichtgegorene und 3. gegorene mit den nichtgegorenen zusammen und findet, daß sich die letzte Serie der Größe des Zerfalls nach mehr der Portion gegorener Hefe nähert als dem arithmetischen Durchschnitt aus der gegorenen und nichtgegorenen.

Der Zerfall drückte sich in Prozenten wie folgt aus:

	Nach 48 Stdn.	Nach 120 Stdn.
I. Für gegorene Hefe	7,0	27,0
II. „ nichtgegorene	30,0	70,0
III. „ gegorene + nichtgegorene . .	18,0	32,0

Der Zerfall in der III. Portion, der 18% erreichte, stimmt fast vollständig mit dem arithmetischen Mittel aus der I. und II. Portion überein, d. h. der gegorene und nichtgegorenen $\frac{30,0 + 7,0}{2}$; doch bestätigen anscheinend die Resultate des Eiweißzerfalles nach 120 Stunden den Gedanken des Verfassers, daß der Zerfall bei den gegorenen und nichtgegorenen zusammen fast ebenso hoch ist als bei den gegorenen. Durch weitere Versuche beweist der Verfasser, daß das Antienzym durch die Chamberlankerze durchgeht; das übliche Sieden vernichtet die Wirkung der antiproteolytischen Substanzen, doch behält dieselbe ihre Wirksamkeit beim Sieden mit Kühlrohr. Der Verfasser untersucht, ob man nicht die hemmende Wirkung durch Anwesenheit von Spiritus erklären kann; er stellt Versuche mit 4-, 8-, 16 proz. Spiritus an und findet, daß die hemmende Wirkung des Spiritus erst von 4% an beginnt; so betrug der Eiweißstickstoff, der nach der Autolyse in einer Portion Hefe vorhanden war,

vor d. Versuch	ohne Alkohol	4%	8%	16%
51,5 mg	10,4 mg	10,6 mg	34,9 mg	45,6 mg.

Doch zeigte die von L. Iwanoff nach der Gärung gemachte Alkoholbestimmung, daß seine Konzentration nicht hoch genug war, um eine so große Hemmung des Eiweißzerfalles in Hefen zu erklären. Die Anwesenheit von Ameisensäure, von Essigsäure und teilweise von Milchsäure in der gärenden Flüssigkeit kann nach L. Iwanoff die Proteolyse nur beschleunigen. Auf dem Wege der Ausschließung kommt der Verfasser zu der Annahme, daß als Ursache der Hemmung der Acetaldehyd angesehen werden muß, dessen spurenhafte Anwesenheit viel früher konstatiert worden

ist, als er durch die Arbeiten von C. Neuberg[1]) und S. Kostitscheff[2]) eine so große Bedeutung für die Gärungserscheinungen erlangt hat.

Anstatt die Einwirkungen von verschiedenen Konzentrationen des Acetaldehyds auf die Arbeit des proteolytischen Fermentes der Hefe zu untersuchen, verfolgte L. Iwanoff die Lösung von Gelatine in capillaren Röhren, welche er entweder in ein Gemisch von Hefe mit Wasser und Thymol, oder in dasselbe Gemisch mit Zusatz verschiedener Mengen Acetaldehyds, von 0,006% bis 0,2%, hereingelegt hat.

Es stellte sich heraus, daß schon der 0,006 proz. Aldehyd die Lösung der Gelatine durch das proteolytische Hefeferment hinderte; daraus hat der Verfasser den Schluß gezogen, daß „wir bei der Spiritusgärung keine Eiweißzersetzung beobachten, weil die Zelle dabei Aldehyde als Nebenprodukte der Gärung bildet, welche die zersetzende Wirkung des proteolytischen Enzyms verhindern". Der Verfasser hat dabei die recht ungenaue Methode von Mett angewandt.

L. Iwanoffs Versuche über die Bedeutung des Acetaldehyds beim Zerfall des Hefeeiweißes wurden von W. Zaleski und W. Schataloff[3]) einer ausführlichen Kritik unterworfen; diese Verfasser untersuchten, inwieweit der Aldehyd den Zerfall des Eiweißes in Hefen aufhalten kann. Es wurde von den Verfassern darauf hingewiesen, daß nicht nur 0,006 proz., sondern sogar 0,05 proz. Aldehyd gar keine Wirkung auf diesen Prozeß ausübt; 0,18% führen nur eine unbedeutende Abschwächung desselben bei Hefanol, nicht bei Hefen, herbei und nur 0,5 proz. Aldehyd drängt die Proteolyse bedeutend zurück, doch weniger als in L. Iwanoffs Versuchen. In der letzten Zeit zeigte W. Palladin[4]), daß das Eiweiß des Zymins sowohl in Wasser als auch in 1 proz. Lösung des Kalisalzes der Brenztraubensäure fast gleich schnell zerfällt; sonach übte die Bildung kleinerer Quantitäten von Aldehyd bei der Zersetzung des Salzes der Brenztraubensäure während der Selbstgärung fast gar keine Wirkung auf den Zerfall des Eiweißes in Hefen aus. Kostitscheff und Brilliant[5]) gaben an, daß Zinkchlorid die Vergärung des Zuckers durch trockene Hefe bedeutend zurückhält und daß dabei eine verhältnismäßig hohe Anreicherung des Acetaldehyds beobachtet wird. Indessen bemerkt man in Gegenwart von Zinkchlorid eine nur recht unbedeutende Abschwächung des Eiweißzerfalles; mit Zinkchlorid, ohne Zusatz von Zucker, wird eine gewisse Erhöhung des Eiweißzerfalles beobachtet.

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **31**, 170. 1911 u. folgende Bände.
[2]) S. Kostitscheff, Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 130. 1912.
[3]) W. Zaleski und W. Schataloff, diese Zeitschr. **55**, 63. 1913.
[4]) W. Palladin, Mitt. d. Akad. d. Wiss. 1916, S. 527.
[5]) S. Kostitscheff und W. Brilliant, Zeitschr. f. phys. Chem. **85**, 507. 1913.

Sonach sprechen sämtliche Angaben dafür, daß der Acetaldehyd keine bemerkbare Wirkung auf den Eiweißzerfall ausübt, nicht nur bei denjenigen winzigen Quantitäten von Acetaldehyd, welche bei einer normalen Gärung vorkommen, sondern auch bei Einführung größerer Mengen.

Des weiteren ist es L. Iwanoff zu zeigen gelungen, daß beim Zusatz von sauerem Phosphat zur gärenden Flüssigkeit und darauffolgenden Autolyse sich Eiweißstoffe sogar besser zersetzen, als in nicht gegorenen Hefen. Auf Grund dieser Beobachtung wurde vom Verfasser der Schluß gezogen, daß die Wirkung antiproteolytischer Substanzen (hauptsächlich des Acetaldehyds) mit Hilfe des saueren Phosphates beseitigt werden kann.

Vom chemischen Standpunkte aus ist es schwerlich zu begreifen, in welcher Weise das KH_2PO_4 eine nachteilige antiproteolytische Wirkung des Acetaldehyds beseitigen kann; ist doch dessen Wirkung, nach meinen Angaben, auf eine Erhöhung der H-Ionenkonzentration zurückzuführen. Unzweifelhaft bilden sich aber bei der Gärung gewisse Substanzen, welche den Eiweißzerfall hemmen.

Meine Aufgabe war es, die Wirkung der Gärungsprodukte auf den Eiweißzerfall zu verfolgen und die Ursache ihres hemmenden Einflusses zu finden, wobei ich mich verschiedener Hefepräparate bediente. Dieser letzte Umstand ist besonders wichtig, weil nicht alle Hefe auf dieselben Einflüsse gleichsinnig reagieren.

Ich habe schon Gelegenheit gehabt zu beobachten, daß das KH_2PO_4 eine ungleiche Wirkung auf Hefe ausüben kann, deren physiologischer Zustand verschieden ist. Die Wirkung des saueren Phosphats ist nach meinen Angaben[1]) auf die Beschleunigung der Arbeit der Protease, nicht der Peptase der Hefe zurückzuführen. Diese Arbeit kann mit dem Übergang des Fermentes vom zymogenen Stadium in das aktive verknüpft sein. Die Wirkung des KH_2PO_4 hängt von einer bestimmten Konzentration der H-Ionen ab; ich hatte vor, seine Wirkung auf frische Hefe zu kontrollieren und zu sehen, ob nicht ein prinzipieller Unterschied zwischen seiner Wirkung auf gegorene und nicht gegorene Hefe besteht.

Versuch 1: A. Lebende Hefe der Fabrik zu Kursk Karjakin wurden in einem Mörser mit Toluol zerrieben und 1 Stunde bei 47° C stehengelassen; darauf wurden Portionen von je 5 ccm abgenommen und mit Toluol 36 Stunden bei 47° C der Autolyse unterworfen. Die Fällung der Eiweiß-

[1]) N. N. Iwanoff, Biochemical Journ. **12**. 1917—18.

stoffe wurde durch Kupferhydroxyd erzeugt. Folgende Mengen von Eiweißstickstoff wurden bestimmt in Milligramm:

		Zerfall in %
1. Kontrollportion 5 ccm Hefe	55,9	—
2. 36 Stdn. Autolyse bei 47° C mit 20 ccm Wasser .	19,4	65,3
3. desgl., doch 0,3 g KH_2PO_4 zugesetzt	21,5	61,6

B. Dieselben Hefen, doch vorläufig 2 Tage lang mit Zucker gegoren, wurden nach Filtration der Gärungsprodukte mit 120 ccm Wasser durchgerührt, Proben von je 20 ccm abgenommen und ebenso wie die nichtgegorenen behandelt, doch wurde die Autolyse bei 40° C ausgeführt[1]).

		Zerfall in %
1. Kontrollportion, 20 ccm Hefe	77,3	—
2. 36 Stunden Autolyse bei 40° C mit 20 ccm Wasser	40,2	47,7
3. desgl., doch 0,3 g KH_2PO_4	46,7	39,6

Der Zusatz von KH_2PO_4 hat den proteolytischen Zerfall nicht nur beschleunigen können, er hat denselben sogar etwas zurückgehalten; in dieser Beziehung ist kein prinzipieller Unterschied zwischen gegorenen und nicht gegorenen Hefen beobachtet worden. Die Hefe hat sich der saueren Lösung gegenüber sehr empfindlich erwiesen; die Erhöhung der Konzentration der H-Ionen machte die Lösung weniger vorteilhaft. Da die Rolle des KH_2PO_4 in der Überführung der Proteose aus dem Zymogenstadium in die aktive Form besteht, haben die lebenden Hefen in diesem Falle anscheinend das Ferment schon in der aktiven Form erhalten, weil das KH_2PO_4 sonst auf den Eiweißzerfall eine vorteilhafte Wirkung ausgeübt haben müßte.

Des weiteren wollte ich mich davon überzeugen, daß die hindernde Wirkung nicht von den gegorenen Hefen selbst, sondern von den Gärungsprodukten ausgeübt wird.

Versuch 2: I. Zu 30 g frischer Hefe wurde 30 g Zucker und 250 g Wasser zugesetzt; nach Verlauf von 24 Stunden, als der ganze Zucker vergoren und die Gärungsprodukte abfiltriert waren, wurde die Operation wiederholt. Die Hefe vergor noch 30 g Zucker und nach Verlauf eines weiteren Tages noch 20 g; nach Beendigung der Gärung wurden die Gärungsprodukte abfiltriert, die Hefe mit Wasser gewaschen, im Mörser mit Toluol mit Toluol zerrieben und 1 Stunde lang in den Thermostaten bei 47° C gestellt; darauf wurden mit der Pipette Proben von je 5 ccm abgenommen.

II. Dasselbe wurde mit nichtgegorenen Hefen gemacht; nach dem Waschen mit Wasser wurden dieselben durch Toluol und Erhitzen im Thermostat bis 47° C getötet.

[1]) Die Autolyse der nichtgegorenen Hefe der 1. Serie wurde bei 47° C ausgeführt, die der gegorenen (2. Serie) bei 40° C; sonach darf man die beiden Serien nicht miteinander vergleichen.

Zum Versuch wurden zu je 5 ccm sowohl der einen als auch der anderen Hefe entweder 15 ccm Wasser oder 15 ccm Gärungsprodukte hinzugesetzt; sie bestanden aus einer saueren Flüssigkeit mit 5,5% Alkoholgehalt.

Die Kontrollportionen sowohl gegorener als auch nichtgegorener Hefe wurden sofort durch Kupferhydroxyd niedergeschlagen, während die Versuchsportionen 36 Stunden lang bei 47° C mit Toluol stehengelassen wurden.

Nichtgegorene Hefe[1]).

	mg N nach Stutzer	Eiweißzerfall in %
1. Kontrollportion	66,5	0
2. Wasser, 36 Stunden Autolyse bei 47° C .	25,5	61,6
3. desgl., doch mit Gärungsprodukten . . .	37,7	43,4

Gegorene Hefe.

	mg N nach Stutzer	Eiweißzerfall in %
1. Kontrollportion	55,9	0
2. Wasser, 36 Stunden Autolyse bei 47° C .	19,4	65,3
3. desgl., doch mit Gärungsprodukten . . .	31,1	44,4

Der Zerfall des Eiweißes in Hefen wird durch die Gärungsprodukte ziemlich stark verhindert, doch ist hier kein Unterschied zwischen der Einwirkung auf gegorene und nicht gegorene Hefe zu bemerken. Während der Periode der neuen Gärung haben Hefe keine in Wasser löslichen antiproteolytischen Substanzen erworben, welche ihr Eiweiß vor Zerfall geschützt hätten; die Stärke der Protease hat sich während der Gärung anscheinend auch nicht verändert; die hemmende Wirkung muß auf Rechnung der löslichen Produkte gesetzt werden. Da, nach L. Iwanoffs Angaben, die hemmende Wirkung der Gärungsprodukte auf den Zerfall des Eiweißes durch Einführung von sauerem Phosphat beseitigt werden kann, so habe ich diese Andeutungen benutzt, um den Unterschied des Eiweißzerfalles in gegorenen und nicht gegorenen Hefen klarzustellen. Außerdem habe ich unter den gegebenen Bedingungen die Arbeit der Peptase gemessen, indem ich das Quantum der Aminogruppen nach van Slyke bestimmt habe.

Versuch 3: Es wurden 3 Portionen lebender Hefe zu je 30 g genommen.

A gor 20 Stunden in 200 ccm 10 proz. Saccharose.

B desgl., doch mit Zusatz von 3 g KH_2PO_4.

Nach Verlauf von 20 Stunden war der ganze Zucker in den Portionen A und B vergoren.

[1]) Diese Bezeichnung ist in dem Sinne zu verstehen, daß ich die Hefe nicht habe gären lassen.

C 30 g Hefe wurden mit 200 ccm Wasser durchgerührt und blieben 20 Stunden lang bei 3—5° C stehen.

Nach Verlauf von 20 Stunden sind aus sämtlichen Portionen, nachdem sie sorgfältig durchgeschüttelt worden waren, Proben von je 20 ccm abgenommen worden; nach Erhitzung mit Toluol und Chloroform bis 50° C wurden diese Proben bei 47° C 40 Stunden autolysiert[1]). Die Fällung wurde durch Kupferhydroxyd erzeugt.

Der Eiweißzerfall drückte sich in Milligramm wie folgt aus:

	Ursprüngl. Inhalt von N	Zerfall in mg	Zerfall in %
C nicht gegorene	49,1	26,3	53,6
A gegorene ohne KH_2PO_4	53,4	17,9	33,5
B gegorene mit KH_2PO_4	53,1	17,6	33,2
A + C nichtgegorene wurden mit gegegorenen vereinigt	102,5	46,9	45,7
B + C nichtgegorene wurden mit den mit KH_2PO_4 gegorenen vereinigt	102,2	48,2	47,1
A + B ohne KH_2PO_4 gegorene wurden mit den mit KH_2PO_4 gegorenen vereinigt	106,5	39,1	36,7

In den zusammengegossenen Portionen drückt sich der Eiweißzerfall in Prozenten aus:

A + C	B + C	A + B
45,7	47,1	36,7

Arithmetisches Mittel aus Portionen die einzeln autolysiert wurden:

43,6%	43,4%	33,4%

Außerdem wurde in den Portionen A, B und C nach 40 Stunden Autolyse bei 47° C der Stickstoff nach van Slyke bestimmt:

	Eiweiß nach Stutzer zerfallen	Stickstoff nach van Slyke gebildet
C nichtgegorene	53,6	28,7
A ohne KH_2PO_4 gegorene	33,5	9,2
B mit KH_2PO_4 gegorene	33,2	6,3

Aus 100 mg des zerfallenen Eiweißes hat sich Stickstoff nach van Slyke gebildet:

C	53,5
A	27,5
B	19,0

Aus diesem Versuch geht mit Sicherheit hervor, daß die Gärungsprodukte den autolytischen Zerfall des Eiweißes hemmen, doch hat der Zusatz von KH_2PO_4 zu der Gärflüssigkeit, im Gegensatz mit den Angaben L. Iwanoffs, keine Unterbrechung der

[1]) Die Proben wurden teils einzeln autolysiert, teils zusammengegossen.

schädlichen Wirkung der Gärungsprodukte zur Folge gehabt. In den zusammengegossenen Portionen gegorener und nicht gegorener Hefe fällt die autolytische Zersetzung des Eiweißes fast vollständig mit dem Eiweißzerfall der einzelnen autolytischen Portionen zusammen; dieses Resultat widerspricht ebenfalls den Angaben von L. Iwanoff. Noch eine Schlußfolgerung aus dem beschriebenen Versuch soll unterstrichen werden; bei der Autolyse der gegorenen Hefe, die mit den Gärungsprodukten zusammen genommen wurden, verminderte sich die Arbeit der Peptase beträchtlich, welche an der Menge des gebildeten Stickstoffs nach van Slyke gemessen wird; diese Abschwächung ist an der Phosphatportion noch deutlicher. Die sauere Umgebung der Gärungsprodukte verdoppelte die Hemmung der Peptasearbeit. Diese Erscheinung erinnerte mich an die Beeinträchtigung der peptischen Funktion des proteolytischen Fermentes in den Spiritusversuchen, die früher[1]) von mir beschrieben worden sind. Da die Gärungsprodukte stets Alkohol enthalten, so entschloß ich mich, vergleichende Versuche über die Beeinflussung des Hefeeiweißzerfalls durch Gärungsprodukte einerseits und diejenigen Spirituskonzentrationen, welche sich in diesen Produkten befinden, andererseits anzustellen.

Versuch 4: Lebende Hefe, 3 Portionen zu je 10 g, sind im Mörser zerrieben worden.

I. Mit 50 ccm Wasser.
II. Mit 50 ccm Gärungsprodukten[2]), die 6,8% Alkohol enthielten;
III. Mit 50 ccm 6,8 proz. Alkohol.

Von jeder Serie wurden 2 Proben zu je 20 ccm abgenommen und eine Kontrollprobe zur Bestimmung des ganzen Eiweißstickstoffs, dessen Gesamtmenge 92,4 mg betrug.

Die Autolyse der Portionen mit Toluol dauerte 42 Stunden bei 44—46°. Der Eiweißzerfall drückte sich in Prozenten wie folgt aus:

I. Mit Wasser	50,9
II. Mit Gärungsprodukten, 6,8% Alkohol enthaltend	31,4
III. Mit 6,8 proz. Alkohol	43,6

Die Gärungsprodukte haben eine größere hemmende Wirkung ausgeübt, als der Alkohol gleicher Konzentration. Da die Reaktion der Produkte ziemlich stark sauer war, so habe ich weitere

[1]) N. N. Iwanoff, Biochemical Journ. 12. 1917—18.

[2]) Die Gärungsprodukte sind auf folgende Weise erhalten worden: 40 g Hefe wurden mit 200 ccm 15 proz. Zucker auf 24 Stunden bei 26° C der Gärung überlassen; als sämtlicher Zucker vergoren war, wurde eine klare Flüssigkeit abfiltriert, die 6,8% Alkohol enthielt.

Versuche angestellt, um mich zu überzeugen, ob nicht die Ursache der Hemmung des Eiweißzerfalles in der überschüssigen Säure bestand. Doch muß ich vorläufig bemerken, daß die Aldehydreaktion mit fuchsinschwefliger Säure im Destillat der Gärungsprodukte sowohl in diesem Versuch, als auch in den nächsten äußerst schwach war — es wurde eine kaum erkennbare Rosafärbung erhalten. Aus der oben erwähnten Literatur folgt, daß der Aldehyd nur in dem Falle eine Wirkung ausüben kann, wenn er in wirklich merklicher Konzentration zugegen ist; da jedoch nur Spuren von Aldehyd auftreten, so vermag ich demselben keine Bedeutung zuzuschreiben.

Versuch 5: 20 g lebender Hefe vergoren nach Verlauf von 24 Stunden 200 ccm. 15 proz. Zuckers. Die Hefe wurde von den Produkten abfiltriert, im Mörser mit Toluol verrieben und 1 Stunde im Thermostat bei 46° C stehengelassen; darauf wurde sie mit Wasser bis auf 50 ccm verdünnt mit der Pipette wurden Proben von je 5 ccm abgenommen und zur Autolyse aufgestellt: 1. Mit 20 ccm Wasser; 2. mit 20 ccm Gärungsprodukten; 3. mit 20 ccm Gärungsprodukten, die vorläufig mit Ätznatron gegen Lackmus neutralisiert worden waren.

Die Autolyse dauerte 40 Stunden bei 46—48° C. In der Kontrollportion wurden 34,1 mg Eiweißstickstoff bestimmt. Im Resultat drückte sich der Zerfall wie folgt in Prozenten aus:

1. Wasser	43,6
2. Gärungsprodukte	18,3
3. Neutralisierte Gärungsprodukte . . .	40,0

Es stellte sich heraus, daß die Neutralisation der saueren Produkte ihre hemmende Wirkung bedeutend vermindert, doch erscheinen als hemmende Faktoren außer der Säure in erster Linie Alkohol und noch gewisse andere Substanzen. Man muß dabei im Auge behalten, daß die Reaktion der dritten Portion, zu der neutralisierte Gärungsprodukte hinzugefügt worden sind, doch etwas sauer war, weil die gärenden Hefen selbst eine sauere Reaktion aufwiesen; würde das Medium vollständig neutral sein, so würde der 7,5 proz. Alkohol, der in diesen Produkten vorhanden war, ohne Zweifel selbst eine große Hemmung hervorrufen.

Der nächste Versuch wurde mit Hefanol ausgeführt, das ich aus Hefen bereitet hatte. Preßhefe wurde mit Aceton zerrieben, rasch abgenutscht und nach Waschen mit Äther im Vacuumexsiccator getrocknet. Das Hefanol besaß ein stark wirkendes proteolytisches Ferment, doch erwies es sich gegen die sauere Reaktion der Gärungsprodukte und des saueren Phosphates sehr empfindlich.

Versuch 6: Portionen aus Hefen bereiteten Hefanols mit 30 ccm Flüssigkeit. Autolyse mit Toluol 46 Stunden bei 44—48° C. Das Quantum des Eiweißstickstoffs variierte in einzelnen Portionen von 90,0—93,3 mg. Die Eiweißfällung wurde nach Stutzer erzeugt.

	Eiweißzerfall in %
1. 30 ccm Wasser	69,9
2. 30 ccm saurer Gärungsprodukte	30,4
3. desgl., doch wurden Gärungsprodukte auf Lackmus neutralisiert	55,0
4. desgl. (wie 3), doch 0,3 g KH_2PO_4 hinzugesetzt	56,0
5. 30 ccm Produkte, 2 mal aus der saueren und alkalischen Lösung destilliert	55,3
6. 30 ccm 6,7 proz. Alkohol	55,0

Die Produkte wurden nach 24stündiger Gärung von 30 g Hefen mit 30 g Zucker und 200 g Wasser bei 30° C erhalten. Nach vollständiger Vergärung wurde eine schwach sauere klare Flüssigkeit erhalten. Zu der 5. Portion wurden die Gärungsprodukte 2 mal aus der saueren und der alkalischen Lösung in einen mit Schnee gekühlten Kolben destilliert; die Alkoholbestimmung nach Nicloux zeigte, daß die Gärflüssigkeit 6,7% Alkohol enthielt. Das Destillat gab mit fuchsinschwefliger Säure eine schwache Reaktion.

Aus dem Versuche geht hervor, daß die Gärungsprodukte den Eiweißzerfall stark beschränkt haben; waren dieselben jedoch gegen Lackmus neutralisiert, so verminderte sich die Hemmung sehr bedeutend. Ziehen wir die in der 3., 5 und 6. Portion erhaltenen Resultate in Betracht, so stellen wir fest, daß die destillierten Produkte, welche von sämtlichen Substanzen mit Ausschluß der flüchtigen befreit worden sind, einen gleichstarken Zerfall hervorgerufen haben wie die neutralisierten Produkte einerseits und wie der Alkohol der entsprechenden Konzentration (6,7%) andererseits. Hier soll darauf hingewiesen werden, daß beim Studium verschiedener Faktoren, welche auf den Eiweißzerfall Einfluß ausüben, die Konzentrationen der H-Ionen in der Lösung zu wenig beachtet worden ist, indessen besitzt dieser Faktor bei der Arbeit des proteolytischen Fermentes eine große Bedeutung. Für die optimale Arbeit der Protease ist eine saure Reaktion unbedingt nötig, doch wenn die Konzentration der H-Ionen eine gewisse Grenze überschreitet, wird eine umgekehrte Wirkung bemerkbar, d. h. eine Abschwächung der Proteolyse. Unter den flüchtigen Produkten hat in meinen Versuchen nur der Alkohol eine hemmende Wirkung ausgeübt; die vorhandenen Aldehydspuren spielen gar keine Rolle,

da kein Unterschied besteht zwischen den destillierten Gärungsprodukten aus der 5. Portion und der entsprechenden Alkoholkonzentration aus der 6.

Angesichts der abweichenden Ergebnisse gegenüber L. Iwanoffs Versuchen komme ich zu der Überzeugung, daß wir es scheinbar mit Hefepräparaten verschiedener Herkunft und verschiedenen physiologischen Zustandes zu tun hatten.

Zum Zwecke eines genaueren Studiums der Einwirkung der Gärungsprodukte habe ich einige Versuche mit trockenen Hefen angestellt, die nach Lebedew bereitet waren; schon die ersten Versuche haben Bedenken hervorgerufen: es stellte sich heraus, daß die Gärungsprodukte den Eiweißzerfall fast gar nicht verhinderten, doch übte das Destillat dieser Produkte, das unter Beachtung sämtlicher Vorsichtsmaßregeln bereitet worden war, eine bedeutende Hemmung des Eiweißzerfalles aus.

Versuch 7: Ca. 1,4 g trockener Hefe pro Portion wurden mit 20 ccm Flüssigkeit autolysiert. Das Quantum des Eiweißstickstoffes variierte zwischen 106,6 mg und 110,9 mg. Die Autolyse dauerte 38 Stunden bei 44—48° C.

Fällung des Eiweißes nach Stutzer.

		Eiweißzerfall in %	
1.	20 ccm Wasser	63,8	63,8
2.		63,8	
3.	20 ccm des Destillates der Gärungsprodukte	49,4	49,6
4.		49,9	
5.	20 ccm der Gärungsprodukte	62,0	61,9
6.		61,8	

Die Gärungsprodukte sind durch Vergärung von 30 g Zucker und 30 g Hefe in Gegenwart von 250 ccm Wasser erhalten worden; nach Verlauf von 15 Stunden war sämtlicher Zucker verbraucht. Das nach Abfiltrieren der Hefe gewonnene klare Filtrat enthielt 5,5% Alkohol; für die 3. und 4. Portion wurden 50 ccm dieser Produkte 2 mal unter Beobachtung aller Vorsichtsmaßregeln destilliert. Vergleicht man die 1. und 2. Portion mit der 5. und 6., so bemerkt man scheinbar ein Ausbleiben der hemmenden Wirkung der Gärungsprodukte, doch genügte es, auf Hefe durch die flüchtigen Destillationsprodukte einzuwirken, um die Arbeit der Protease stark zu verlangsamen. Sonach sind in den Gärungsprodukten gewisse nichtflüchtige Substanzen anwesend, welche die hemmende Wirkung der flüchtigen Gärungsprodukte unterbinden. Vielleicht

übte in diesem Falle nur Alkohol die hemmende Wirkung aus; um mich davon zu überzeugen, wurde zum Vergleich anstatt der destillierten Produkte dieselbe Alkoholkonzentration zugesetzt, welche auch in den Gärungsprodukten enthalten war. Das Resultat war dasselbe.

Versuch 8: Ca. 1,1 g trockener Hefe pro Portion wurden 38 Stunden bei 42—44° C autolysiert. Die Menge des Eiweißstickstoffs variierte in einzelnen Portionen von 70,5—72,7 mg.

		Eiweißzerfall in %	
1.	20 ccm Wasser	48,6	48,6
2.		48,7	
3.	20 ccm 5 proz. Alkohol	27,6	27,6
4.	20 ccm Gärungsprodukte, 5% Alkohol enthaltend	42,6	42,6

Die Gärungsprodukte sind durch Vergärung von 30 g Zucker mit 25 g lebender Hefe und 300 ccm Wasser erhalten worden; nach Verlauf von 18 Stunden war der Zucker verbraucht. Die abfiltrierte klare Flüssigkeit enthielt 5% Alkohol.

Im Einklang mit früheren Versuchen ist auch hier deutlich wahrzunehmen, daß der Alkohol den Eiweißzerfall bedeutend zurückhält, doch üben Gärungsprodukte, die ein gleiches Quantum Alkohol enthalten, fast gar keine Wirkung aus. So lag die Vermutung nahe, daß der Rückstand nach der Destillation flüchtiger Produkte die Rolle eines Aktivators beim Eiweißzerfalle spielt; deshalb habe ich Alkohol im Vakuum destilliert und den Rückstand für den nächsten Versuch benutzt.

Versuch 9: Ca. 1,4 g trockener Hefe mit 20 ccm Flüssigkeit pro Portion. Autolyse 40 Stunden bei 45—47° C. Das Quantum von Eiweißstickstoff variierte von 107,1—112,7 mg.

		Eiweißzerfall in %	
1.	20 ccm Wasser	64,6	64,3
2.		64,2	
3.	20 ccm Gärungsprodukte, 4,6% Alkohol enthaltend	59,7	59,5
4.		59,3	
5.	20 ccm Gärungsprodukte, 2 mal destilliert	50,0	49,8
6.		49,7	
7.	20 ccm Rückstand nach Abdestillation v. Alkohol aus d. Gärungsprodukten	63,2	63,1
8.		63,0	

Die Gärungsprodukte sind durch Vergärung von 30 g Zucker in Gegenwart von 250 ccm Wasser mit 30 g Hefe erhalten worden;

nach Verlauf von 15 Stunden wurden sie abfiltriert und 50 ccm davon 2 mal aus saurer und alkalischer Lösung abdestilliert; der Alkoholgehalt war 4,6%; das Destillat wurde für die 5. und 6. Portion genommen; 100 ccm davon wurden im Vakuum bei 40° C bis auf 2 ccm gelber Flüssigkeit von sauerer Reaktion verdampft; diese Flüssigkeit wurde mit Wasser bis auf 50 ccm verdünnt und davon je 20 ccm für die 7. und 8. Portion genommen.

Es wurden dieselben Resultate erzielt wie im vorhergehenden Versuch — eine schwache Hemmung wurde beim Zusatz saurer Gärungsprodukte beobachtet; ihre hemmende Kraft erhöhte sich nach der Destillation der Produkte; doch übte der Rückstand, wie aus der 7. und 8. Portion ersichtlich, fast gar keine Wirkung aus. Im nächsten Versuche habe ich die Gärungsprodukte neutralisiert, da mir schien, daß die hemmende Wirkung des Alkohols, welcher in den Gärungsprodukten enthalten ist, nur durch den Säuregehalt vermindert wird.

Versuch 10: Ca. 1,1 g trockener Hefe mit 20 ccm Flüssigkeit pro Portion. Die Autolyse dauerte 20 Stunden bei 45—48° C. Der Inhalt an Eiweißstickstoff variierte von 88,4—90,9 mg.

		Eiweißzerfall in %	
1.	20 ccm Wasser	53,6	53,6
2.		—	
3.	20 ccm Gärungsprodukte, auf Lackmus neutralisiert	32,6	32,4
4.		32,2	
5.	20 ccm Gärungsprodukte, 2 mal aus saurer u. alkalischer Lösung dest.	39,0	38,9
6.		38,7	

Die Gärungsprodukte sind durch Vergärung von 20 g Hefe mit 30 g Zucker in 200 ccm Wasser während 24 Stunden erhalten worden; die abfiltrierte klare Flüssigkeit wurde ein wenig mit Wasser verdünnt und 2 mal aus saurer und alkalischer Lösung destilliert, so daß das ursprüngliche Volumen erhalten wurde. Das Destillat ist für die 5. und 6. Portion genommen worden. Ein Teil der Produkte ist durch einige Tropfen 10 proz. NaOH neutralisiert worden und für die 3. und 4. Portion verwendet worden.

Aus dem Versuch ist ebenfalls ersichtlich, daß die Neutralisation der Gärungsprodukte sich als unvorteilhafter Faktor beim Eiweißzerfall erwiesen hat; die neutralisierten Produkte übten ihre hemmende Wirkung fast in demselben Maße aus wie die destillierten in der 5.—6. Portion. Sonach erklärt sich der ungehemmte

Eiweißzerfall bei Zusatz nichtneutralisierter Gärungsprodukte durch Einführung einer bestimmten Konzentration der H-Ionen, welche die hemmende Alkoholwirkung vernichtet. Dank seiner sauren Reaktion erhöht das KH_2PO_4 den Eiweißzerfall, doch übt es in Gegenwart der saueren Gärungsprodukte gar keine Wirkung aus.

Versuch 11: Ca. 1,1 g trockener Hefe mit 20 ccm Wasser pro Portion, von 69,8—71,7 mg Eiweißstickstoff enthaltend. Autolyse 44 Stunden bei 47° C. Die Gärungsprodukte sind durch eine vollständige Vergärung von 20 g Hefe mit 15 g Zucker in 100 ccm Flüssigkeit erhalten worden. Wie immer wurde zu den Portionen Toluol hinzugefügt.

	Eiweißzerfall in %
1. 20 ccm Wasser	51,8
2. desgl. + 0,3 g KH_2PO_4	65,0
3. 20 ccm Gärungsprodukte	43,7
4. desgl. + 0,3 g KH_2PO_4	44,4

Der Zusatz von KH_2PO_4 zur Lösung der Gärungsprodukte hat gar keinen Effekt hervorgerufen.

Endlich sollen noch die Ursachen erläutert werden, die die Schwankungen der Wirkung nicht neutralisierter Produkte bewirken; in den einen Fällen wird die hemmende Alkoholwirkung durch die saure Reaktion fast vernichtet, in den anderen ruft der Zusatz von Produkten eine deutliche Hemmung hervor. Im nächsten Versuch wurde der Einfluß verglichen: 1. der sauren Produkte, 2. der neutralisierten, 3. der zur Hälfte neutralisierten und 4. des Alkohols in derselben Konzentration, welche in den Gärungsprodukten enthalten war.

Versuch 12: Ca. 1,1 g trockener Hefe der Fabrik Post mit 20 ccm Flüssigkeit pro Portion. Autolyse 38 Stunden bei 44—48° C. Das Quantum von Eiweißstickstoff variierte von 67,4—71,7 mg.

	Eiweißzerfall in %
1. 20 ccm Wasser	49,3
2. 20 ccm Gärungsprodukte	36,0
3. 20 ccm halbneutralisierter Gärungsprodukte	42,2
4. 20 ccm neutralisierter Gärungsprodukte	25,8
5. 20 ccm 7 proz. Alkohol	26,1

Die Gärungsprodukte wurden wieder aus einer 24stündigen Gärung von 30 g Zucker mit 30 g Hefe in 200 ccm Wasser bei 30° C gewonnen. Nach vollständigem Zuckerverbrauch wurde eine saure klare Flüssigkeit

erhalten; die durch 10proz. NaOH neutralisierten Produkte wurden zu der 4. Portion verwandt; die halbneutralisierten Gärungsprodukte der 3. Portion sind durch Zusatz der Hälfte des NaOH-Quantums erhalten worden, welches zur Neutralisation der 4. Portion gebraucht worden war.

Die Hemmung des Zerfalles durch die sauren Gärungsprodukte ist also ziemlich bedeutend, die Halbneutralisation (der 3. Portion) vermindert dieselbe, augenscheinlich infolge der Änderung der H-Ionen-Konzentration, die der für Hefeproteolyse optimalen näher gerückt war. Die bei vollständiger Neutralisation der Gärungsprodukte beobachtete starke Verlangsamung des Eiweißzerfalls gleicht vollkommen der von einer äquimolekularen Alkoholkonzentration erzielten Wirkung. Diese Tatsache muß als neuer Beweis dafür angesehen werden, daß der Alkohol diejenige Substanz ist, die in der Hauptsache für die Hemmung der Proteolyse verantwortlich zu machen ist. Sonach folgt aus den Versuchen, daß in den Gärungsprodukten zwei Faktoren einen Einfluß auf die Proteolyse ausüben — der Alkohol und die Konzentration der H-Ionen. Die Wirkung des ersten Faktors besteht stets in einer Hemmung des Eiweißzerfalls, die des zweiten, der H-Ionenkonzentration, kann sich entweder in der Aktivierung der Protease äußern und in diesem Falle bei optimaler Konzentration die Alkoholwirkung[1]) nahezu aufheben oder beim Überschreiten des Optimums gar nicht in Erscheinung treten. In diesem Falle kann man durch Verminderung des Säuregehalts die Konzentration der H-Ionen dem Optimum nähern, wie im 12. Versuch beschrieben ist; die hemmende Alkoholwirkung wird dabei fast aufgehoben.

Des weiteren führe ich noch zwei Versuche an über den Einfluß von KH_2PO_4 in Gegenwart von Alkohol.

Versuch 13: Ca. 1,1 g trockener Hefe mit 40 ccm Flüssigkeit pro Portion. Die Autolyse mit Toluol dauert 36 Stunden bei 40—44° C. Das Quantum von Eiweißstickstoff variierte in einzelnen Portionen von 92,9 bis 94,8 mg.

	Eiweißzerfall in %
1. 40 ccm Wasser	54,3
2. desgl. + 0,4 g KH_2PO_4	67,9
3. 40 ccm 7proz. Alkohol	44,8
4. desgl. + 0,4 g KH_2PO_4	64,9

Der Zusatz von Alkohol übte eine gewisse hemmende Wirkung auf den Eiweißzerfall aus, doch hat der Zusatz von KH_2PO_4 diese

[1]) Es handelt sich um eine nicht hohe Alkoholkonzentration.

Hemmung stark abgeschwächt. Die saure Lösung übte in Gegenwart von Alkohol eine vorteilhaftere Wirkung aus als in dessen Abwesenheit. Die Verfasser, welche den Einfluß von Alkohol auf den Eiweißzerfall studierten, haben die Konzentration der H-Ionen der Lösung nicht in Betracht gezogen, wie ich schon oben erwähnt habe; deshalb sind sie oftmals zu der Überzeugung gekommen, daß der Alkohol entweder gar keinen hemmenden Einfluß ausübt oder daß dessen Einfluß sehr schwach ist. In sämtlichen Fällen, in denen ich den Einfluß von Alkohol studiert habe, hatte die Neutralisation des Autolysates eine große Bedeutung. So übte in einem Versuche ein Zusatz von 6,8 proz. Spiritus zu lebenden Hefen folgende Wirkung aus:

	Eiweißzerfalles in %
Wasser	50,9
6,8 proz. Alkohol	43,6

In einem Parallelversuch dagegen, in dem die Lösung vorläufig neutralisiert war, erwies sich der Zerfall in Prozenten.

in Wasser	43,8
in 6,8 proz. Alkohol	20,7

In neutraler Lösung hat der Alkohol also eine große hemmende Wirkung entfaltet, in schwach saurer eine kaum bemerkbare.

Versuch 14: Ca. 1,2 g trockener Hefe mit 40 ccm Flüssigkeit pro Portion. Toluol. Autolyse 48 Stunden bei 44—46° C. Das Quantum von Eiweißstickstoff wurde auf eine Portion umgerechnet, die 100 mg enthält.

	Eiweißzerfall in %	Stickstoff von neuem nach van Slyke gebildet
1. 40 ccm Wasser	60,2	31,1
2. desgl. + 0,4 g KH_2PO_4	72,8	32,5
3. 40 ccm 8 proz. Alkohol	41,2	11,0
4. desgl. + 0,4 g KH_2PO_4	59,3	12,4

In diesem Versuch wurde eine höhere Spirituskonzentration in Anwendung gebracht. Dennoch hat auch hier der Zusatz von KH_2PO_4 die Hemmung vermindert, welche vom Alkohol allein hervorgerufen worden wäre.

In der 1. Wasserportion erreichte der Zerfall 60,2%, und in der 4., zu der 8 proz. Spiritus und KH_2PO_4 hinzugesetzt wurde, — 59,3%. Die beiden Werte stimmen also nahezu überein.

Bei der Stickstoffbestimmung im Kupferhydroxydniederschlage haben wir jedoch nur die Arbeit der Protease verfolgt und

sind zu der Überzeugung gekommen, daß sie in der 1. und 4. Portion die gleiche Arbeit geleistet hat; es stellte sich aber heraus, daß die Arbeit des zweiten proteolytischen Fermentes — der Peptase — in diesen beiden Ansätzen sehr verschieden war; tatsächlich ist das Quantum des neu erschienenen Stickstoffs nach van Slyke in der 1. Portion 41,1 mg, in der 4. 12,4 mg, auf 100 mg nach van Slyke bestimmten Stickstoff des zerfallenen Eiweißes umgerechnet, kommt auf die Peptasefraktion

in der 1. Portion 51,7 mg N
„ „ 4. „ 20,9 „ N

Es ist auch früher vorgekommen, daß solcher Unterschied in der Arbeit der einzelnen Bestandteile des proteolytischen Hefefermentes auftrat, als ein Zusatz bis 19 proz. Alkohols die Arbeit der Peptase vollständig zum Stillstand brachte, während die Tätigkeit der Protease dadurch nicht beeinträchtigt wurde.

Der Zerfall von Eiweißstoffen wird während der Gärung nicht unterbrochen. Der sich dabei bildende Alkohol ruft eine Hemmung des Zerfalles hervor, doch kann mit dem Heranrücken der Konzentration der H-Ionen an das Optimum ein Medium erzeugt werden, in dem die hemmende Wirkung von Alkohol verschwindet und der Eiweißzerfall ebensogut in Gegenwart von Alkohol als auch ohne denselben verlaufen kann. Es ist richtig, daß eine erhöhte Säurebildung infolge Überschreitens des H-Ionenoptimums wieder die Arbeit der Protease stören kann, doch ist die lebende Zelle imstande, diese Konzentration zu regulieren und die dafür nötigen Bedingungen zu schaffen.

Auf den Vergleich der von mir erhaltenen Resultate mit den Angaben von L. Iwanow zurückgreifend, komme ich zu dem Schlusse, daß unsere Meinungsverschiedenheiten teilweise dadurch erklärt werden können, daß wir mit ungleichen Hefepräparaten gearbeitet hatten. Ich habe bereits Gelegenheit gehabt zu bemerken, daß verschiedene von mir zu den Versuchen angewandte Hefen auf die Einführung von Säuren, Gärungsprodukte und Alkohol nicht gleichsinnig reagieren. Der Zusatz von saurem Phosphat wirkt auf die einen Präparate entweder gar nicht oder negativ, wie es bei lebenden Hefen und bei Hefanol beobachtet wird; bei anderen, z. B. Trockenhefen, ruft KH_2PO_4 eine Beschleunigung der Hefeproteolyse hervor. Im ersten Falle üben die Gärungsprodukte eine stark hemmende Wirkung aus; ihre Neutralisierung führt zur

Erhöhung des Eiweißzerfalles; im zweiten Fall ist die Wirkung entgegengesetzt. In diesem Falle muß man außer dem Säuregrade der Hefe selbst noch ihren physiologischen Zustand in Betracht ziehen, den Zustand namentlich, in welchem sich die Hefeprotease befindet. Außer der Schaffung einer optimalen Konzentration für die Arbeit der Protease hat die saure Sphäre noch Bedeutung beim Übergange des Fermentes aus dem zymogenen Stadium in das aktive; deshalb wird der erwähnte Unterschied zwischen lebenden Hefen und trockenen Präparaten beobachtet; es ist möglich, daß während des Trocknens der Hefe ein Übergang des Ferments in das zymogenen Stadium stattfindet.

Wenn wir zum Schlusse die Faktoren in Betracht ziehen, welche den Eiweißzerfall in den Gärungsprodukten hemmen, so müssen wir dem Alkohol eine außerordentliche Bedeutung zuschreiben. Dagegen sprechen die Versuchsresultate nicht für die Annahme, daß der Aldehyd der Träger der Hemmungserscheinungen ist.

Schlußfolgerungen.

1. In der gärenden Flüssigkeit befinden sich in Übereinstimmung mit den früheren Literaturangaben Substanzen, welche sich während der Gärung der Hefe bilden und den Eiweißzerfall hemmen.

2. Der Zusatz von saurem Phosphat zur gärenden Flüssigkeit unter den Bedingungen meiner Versuche beschleunigte den Hefeeiweißzerfall nicht, wenn die Hefe zuvor getötet und autolysiert war.

3. Tötet man lebende Hefe und läßt in einem Falle Gärungsprodukte, in dem anderen Alkohol, dessen Konzentration der Alkoholkonzentration der Gärungsprodukte gleich ist, auf sie einwirken, so stellt sich heraus, daß die Gärungsprodukte wegen ihrer sauren Reaktion den Eiweißzerfall stärker hemmen als der Alkohol.

4. Die Gärungsprodukte hemmen stark den Eiweißzerfall im Hefanol; nimmt man aber neutralisierte Produkte oder deren Destillat oder Alkohol derjenigen Konzentration, welche sich in den Produkten befindet, so ist die Hemmung gleichstark, doch bedeutend schwächer als bei sauren Produkten.

5. Gärungsprodukte können auf Trockenhefe gar keine Wirkung ausüben; die Hemmung des Eiweißzerfalles fand statt, wenn

die Produkte destilliert waren oder wenn man eine äquimolekulare Alkoholkonzentration benutzte.

6. Das verschiedene Verhalten der Hefepräparate den Gärungsprodukten gegenüber ist durch ihren verschiedenen physiologischen Zustand und ihr ungleiches Verhältnis zur Konzentration der H-Ionen bedingt.

7. Der Zusatz von 7 proz. Alkohol hemmt den Eiweißzerfall in trockenen Hefen stark; der Einfluß von KH_2PO_4 vernichtet die nachteilige Wirkung des Alkohols.

8. In den Gärungsprodukten erscheint Alkohol als Haupthemmungsfaktor des Eiweißzerfalles; seine schwach hemmende Kraft in geringen Konzentrationen ist dadurch zu erklären, daß frühere Autoren ihn zu einer sauren Lösung hinzusetzten, die seine nachteilige Wirkung verringerte.

Die elementaranalytische Methode der direkten Bestimmung von Kohlensäure und Sauerstoff in der Berthelotschen Bombe und ihre Bedeutung für Stoffwechselbilanzen speziell beim Herbivoren.

Von

W. Klein und **Maria Steuber.**

(Aus dem Tierphysiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 26. April 1921.)

Aus der im Harn ausgeschiedenen Stickstoffmenge und aus dem Verhältnis der beiden Atemgase Kohlensäure und Sauerstoff zueinander läßt sich berechnen, wieviel Eiweiß, Fett und Kohlenhydrate im Körper umgesetzt wurden. Da wir die Verbrennungswärme dieser Stoffe kennen, ergibt sich auch auf diesem, die Elementaranalyse umgehenden und deshalb weniger mühsamen Weg die im Körper umgesetzte Energiemenge. Diese Rechnung ist nur ganz einwandfrei bei solchen Tieren, bei denen keine größeren Mengen der Nahrung durch Gärungsprozesse im Verdauungsapparat gespalten und in nicht genau definierbare Produkte übergeführt werden, also beim Fleischfresser und nahezu auch beim Menschen. Bei Tierarten, bei denen besonders die Kohlenhydrate vor der Resorption einer weitgehenden Gärung unterliegen, wo also neben niederen Fettsäuren besonders große Mengen Gärkohlensäure und brennbare Gase, besonders Methan, gebildet werden, ist der aus Versuchen in Respirationskammern gefundene respiratorische Quotient für eine derartige Berechnung unbrauchbar. Der Quotient übersteigt besonders beim Wiederkäuer die Einheit erheblich, was vor allem auf die Gärungsprozesse zurückgeführt werden muß; denn die Fettbildung aus Kohlenhydraten direkt wird in Kanülenversuchen nur während

kurzer Zeit beobachtet[1]). Es kommen auf 1 Liter Methan nach Möllgardt - Andersen[2]) und nach Versuchen des einen von uns[3]) ca. 2,5 Liter Gärkohlensäure. Zieht man diese Werte von der Gesamtmenge der gefundenen Kohlensäure ab, so finden wir respiratorische Quotienten, die mit den in den Kanülenversuchen direkt gefundenen annähernd übereinstimmen. Doch ist bei dieser Größe ein Fehler nicht berücksichtigt: Die aus den Vormägen ins Blut übergetretene Kohlensäure, deren Menge bei dem hohen Absorptionskoeffizienten sicher nicht gering ist; doch darüber ist uns vorläufig nichts bekannt.

So bliebe also für die Herbivoren nur die direkte Bestimmung des Energieumsatzes im Calorimeter, wie es von H. P. Armsby und A. Fries[4]) einerseits, O. Hagemann[5]) andererseits bereits durchgeführt ist. Die Kohlenstoffbilanz allein ist deswegen nicht genügend, weil jede Kontrolle fehlt. Nun haben I. A. Fries[6]) und A. Krogh und Schmitt - Jensen[7]) auf Grund einiger Respirationsversuche an Rindern mit Bestimmung der Methanmenge in Verbindung mit der Verhältniszahl von $CH_4 : CO_2$ bei der Cellulosegärung die zu der gefundenen Methanmenge gehörige Gärkohlensäure berechnet und von der Gesamtkohlensäure abgezogen. Der jetzt berechnete R.-Q. sollte nun die wirklichen Umsetzungen im Organismus zum Ausdruck bringen, doch ist auch dieser Weg nicht genau, weil das Verhältnis von Methan zur Gärkohlensäure in weiten Grenzen schwankt.

Zuntz[8]) hat nun in Berücksichtigung all dieser Momente einen anderen Weg eingeschlagen. Er sagt: „Daß nur die elementaranalytische Bilanz eine Vorstellung vom Energieumsatz und der Fettbildung bei den Herbivoren geben kann. Kann die Messung der Wärmeabgabe nicht direkt durchgeführt werden, so bietet neben der Bilanz der Kohlensäure die Durchführung der Bilanz des Sauerstoffverbrauches der Tiere eine ebenso scharfe und für kürzere Zeiträume exakt durchführbare Rolle. Eine solche Bilanz läßt sich auf Grund der üblichen Elementaranalyse der Nährstoffe und der Ausscheidungen deshalb nicht genau durchführen, weil bei dieser Analyse der Sauerstoffverbrauch nur indirekt bestimmt werden kann, also alle

---

[1]) Nur am Ende intensiven Wiederkauens oder unmittelbar danach findet man R.-Q., die die Einheit erreichen oder auch etwas übersteigen. Hier kann man schließen, daß Kohlenhydrate unvergoren im Stoffwechsel umgesetzt werden.

[2]) Möllgaard und Andersen, D. Kgl. Veterinär og Landbohöjskole. Aarsshrift. 1917.

[3]) W. Klein, diese Zeitschr. **72**. 1915.

[4]) H. P. Armsby und A. Fries, Landw. Jahrb. 1904.

[5]) Hagemann, Landw. Jahrb. (Erg.-Bd.) **1**.

[6]) A. Fries, Amer. journ. of physiol. **55**, Nr. 1. 1921.

[7]) A. Krogh und H. O. Schmitt - Jensen, Biochemical Journ. **14**, Nr. 6. 1920.

[8]) Zuntz, Berl. klin. Wochenschr. 1918, Nr. 17.

analytischen Fehler sich auf ihn häufen." Die von uns jetzt ausgearbeitete Methode der direkten Bestimmung auch des Sauerstoffes in der Calorimeterbombe gibt nun solche Werte, daß sie die Kohlenstoff- und Sauerstoffbilanz mit der gleichen Exaktheit aufzustellen gestattet.

Die erste Idee, die Elementaranalyse mit Hilfe der Berthelotschen Bombe auszuführen, rührt von Berthelot selbst her. Zuntz und Frenzel[1]) haben dann die ersten praktischen Versuche angestellt. Das Endgas wurde berechnet aus Anfangsgas plus Substanz abzüglich der Asche, Wasser, Salpetersäure und dann verglichen mit der durch eine Gasuhr gegangenen Menge Endgas. Das Endgas wurde dann multipliziert mit den in der Gasanalyse gefundenen Werten an Sauerstoff und Kohlensäure. Größere Bedeutung gewann die Methode nicht, weil die Ausführung der Gasanalysen mit der damals gebräuchlichen Apparatur sehr umständlich und auch zeitraubend war. Im Jahre 1912 wurden die Versuche wieder aufgenommen und führten zu praktischen Ergebnissen. Eine kurze Beschreibung wurde damals in den Landwirtschaftlichen Jahrbüchern[2]) veröffentlicht. Um die immerhin sehr viel Sorgfalt erheischende Wägung des Endgases zu umgehen, versuchte auf Veranlassung von Zuntz Diakoff[3]) die Methode zu vereinfachen. Die Bombe wurde nach der Verbrennung mit einem System zur Absorption und Wägung der Kohlensäure verbunden, wie es E. Grafe[4]) zur Anwendung gebracht hatte. Ein gemessener Teil des Endgases wurde über Quecksilber während des Ausströmens aufgesammelt und diente zur gasometrischen Analyse. Mit Hilfe dieser Daten berechnete er die Gesamtmenge des verbrannten Sauerstoffes und des gasförmigen Stickstoffes. Die Einfachheit dieser Methode wäre bestrickend, wenn der Sauerstoff mit derselben Genauigkeit bestimmt werden könnte wie die Kohlensäure, denn die Voraussetzung bei dieser Berechnung ist, daß das Volum der gebildeten Kohlensäure ebenso groß wäre als das des verschwundenen Sauerstoffes, daß das Endgas dem Volumen nach dem Anfangsgas gleich sein müßte. Dies trifft aber nur bei ganz reinen Kohlenhydraten zu, während bei aus Eiweiß, Fett und Kohlenhydraten zusammengesetzten Nahrungsmitteln, mit denen wir es ja gewöhnlich zu tun haben, diese Voraussetzung fehlt. Es tritt infolge Verbrennen des Wasserstoffes zu Wasser eine Volumverminderung ein, die je nach der Zusammensetzung der Futtermittel schwankt. So beträgt z. B. bei Leinkuchen das Volumen des Gases in der Bombe vor der Verbrennung 5893 ccm, nach der Verbrennung 5752 ccm.

	Vor der Verbrennung	nach der Verbrennung
Bei Kleber:	6351 ccm	6264 ccm
Kot bei Fütterung von Rübenblättern, Stroh und Leinkuchen	5886 „	5839 „
Dagegen bei Saccharose	6076 „	6076 „

[1]) Zuntz und Frenzel, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1897, S. 380.
[2]) v. d. Heide, Klein und Zuntz, Landw. Jahrb. **44**, 806. 1913.
[3]) Diakoff, diese Zeitschr. **55**, 116. 1913.
[4]) E. Grafe, diese Zeitschr. **24**. 1910.

Wir haben deshalb diese Modifikation nicht weiter angewandt und führen die Methode nun in folgender, eingehend beschriebener Weise aus.

Nachdem die Bombe innen mit Wasser angefeuchtet und mit der zu verbrennenden Substanz ca. 1,3 g beschickt ist, wird sie mit dem Hebel fest zugedreht und an die Leyboldsche Pumpe angeschlossen. Zwischen der Bombe und der Pumpe ist ein Quecksilbermanometer angebracht. Es wird solange evakuiert, bis die Quecksilberkuppe des inneren Schenkels zur Ruhe gekommen ist. Vollkommen gleiches Niveau stellt sich nicht ein infolge des in der Bombe herrschenden Wasserdampfdruckes. Das Ventil der Bombe wird jetzt geschlossen. Das Gewinde der Bombe wird von jedem anhaftenden Dichtungsfett peinlich gereinigt, worauf besondere Aufmerksamkeit zu legen ist. (Später kommen wir hierauf nochmals zurück.) Jetzt wird die Bombe gewogen. Zu diesem Zwecke ist es von ausschlaggebender Wichtigkeit, eine Wage zu benutzen, die bei einer Tragfähigkeit von 5 kg auf 2 mg ausschlägt[1]). Nun erfolgt das Einlassen des Sauerstoffes aus einem gewöhnlichen Stahlzylinder. Hierbei ist zu beachten, daß der Verbindungsweg, der aus Kupferrohr besteht, gründlich ausgespült wird. Hierauf wird die Bombe mit dem Kupferrohr luftdicht verschraubt, wobei natürlich das Bombenventil innen noch verschlossen ist. Nun öffnet man langsam das Ventil des Sauerstoffzylinders, bis das Manometer ungefähr 40 Atm. anzeigt, dann öffnet man langsam das Ventil der Berthelotschen Bombe, wobei das Manometer bis ungefähr 6 Atm. zurückgeht. Man läßt das Manometer langsam bis 25 Atm. Druck ansteigen, dann schließt man den Zylinder und auch sofort die Bombe. Bei diesen Manipulationen strömen bei einiger Übung fast konstant 7 g Sauerstoff in die Bombe, eine Menge, bei der die Kohlensäure im Verbrennungsgas selten über 20 Vol.-% ansteigt. Nun erfolgt die genaue Wägung des eingelassenen Sauerstoffes, worauf sich die Verbrennung in der bekannten Weise anschließt. Mit dem Öffnen der Ventile und dem Ausströmen des Gases wäre die gewöhnliche Verbrennung beendet. Bei der Elementaranalyse wird die Bombe nun an eine kleine einfache Apparatur angeschlossen, die aus folgenden Teilen besteht: An einem Stativ mit einer verschiebbaren Schiene, an der mehrere Haken sich

[1]) Unsere Wage ist von Rupprecht in Wien gebaut.

befinden, hängen 1. ein zu dem Bombengewinde passendes Metallrohr, 2. ein Dreiweghahn, 3. ein gebogenes Chlorcalciumröhrchen und zuletzt eine mit einem Rückschlagventil versehene kleine Waschflasche, deren tiefer Schenkel in Wasser taucht. Alle 4 Stücke sind mittels Gummischläuchen miteinander gut verbunden. Der freie Stutzen des Dreiweghahnes ist außerdem mit einem 500 ccm fassenden mit Quecksilber gefüllten Sammelgefäß verbunden. Man öffnet jetzt das Auslaßventil der Bombe, jedoch so, daß das Gas nur langsam ausströmt. Nach Verlauf weniger Minuten wird das Endgas in das Gassammelgefäß gesaugt, wieder herausgedrückt, um die Verbindungswege auszuspülen. Darauf wird die endgültige Probe zur Gasanalyse entnommen. Ist die Probeentnahme beendigt, so läßt man das Gas auch weiterhin langsam bis zu Ende ausströmen, um den in dem Gas enthaltenen Wasserdampf in dem Chlorcalciumrohr quantitativ aufzufangen. Ist alles Gas ausgeströmt, wird die Bombe geschlossen und aufs Sorgfältigste getrocknet. Es ist sehr wichtig, daß, wie bereits angedeutet, die freibleibenden Gewindegänge vorher von Fett gereinigt wurden, weil sie sonst bei dieser Abtrocknung mit entfernt und dadurch zu einem Gewichtsverlust führen würden. Durch das Schließen des Ventils wollen wir verhindern, daß durch die unvermeidliche Erwärmung bei der Abtrocknung der Bombe Gasverlust durch Expansion eintreten kann. Dann bleibt die Bombe eine Viertelstunde im Glasgehäuse der Wage stehen. Nach Temperaturausgleich wird das vorhin geschlossene Ventil geöffnet und die Bombe gewogen. Hierbei ist es nötig, daß Temperatur und Barometer abgelesen werden. Zur genauen Feststellung des Gewichtes des Endgases benutzen wir noch eine Kontrolle, die wir dadurch einführen, daß wir die Bombe wieder evakuieren und abermals wägen. Die Gewichtsmenge des Endgases wird in letzterem Falle direkt bestimmt, während in ersterem Falle die in der Bombe verbliebenen Gewichtsteile Gas erst mit Hilfe der Gasanalyse, Temperatur und Barometer usw. berechnet und zu dem durch Wägung gefundenen Gas hinzuaddiert werden.

Es darf nicht vergessen werden, die im Chlorcalciumrohr gewogene Menge Wasser zum Gewicht der Bombe zu addieren.

Da wir bei der Gasanalyse, auf deren technische Ausführung wir am Schluß noch eingehen wollen, sowohl bei dem zur Verbrennung benutzten Sauerstoff als auch bei dem Verbrennungsgas

Volumprozente erhalten, so müssen wir mit Hilfe der spezifischen Gewichte der Gase die einzelnen Bestandteile in Gewichtsprozente umrechnen.

Der Gang der Berechnung und die Genauigkeit des Endvolumens soll an 2 Beispielen erläutert werden.

I. A. Eingeführt in die Bombe 7,146 g Bombensauerstoff.
B. Verbrennungsgas
a) direkt durch Wägung gefunden . . . . . 7,568 g
b) aus Wägung und Berechnung des in der Bombe verbleibenden Gases . . . . . 7,565 g
angewandte Substanzmenge für die Verbrennung . 1,1754 g

Da der käufliche Sauerstoff immer Stickstoff und Edelgase enthält, so ist es nötig, die absolute Menge des Sauerstoffes zu berechnen.

Analyse des Bombensauerstoffes:

99,383 Gew.-% Sauerstoff,
0,617 Gew.-% Stickstoff.

Daraus ergibt sich eine absolute Sauerstoffmenge von
7,102 g O_2 und 44 mg N_2.

Gasanalyse des Endgases:

CO_2 Vol.-%	O_2 Vol.-%	N_2 Vol.-%
19,171	79,868	0,961

Diese Vol.-% werden mit dem spezifischen Gewicht der einzelnen Gase multipliziert. Wir geben sie gleich logarithmisch an.

Vol.-% CO_2 = log 28 264	Vol.-% O_2 = log 90 237	Vol.-% N = log 98272
19,171	79,868	0,961
Spez. Gew. CO_2 = log 29 336	Spez. Gew. O_2 = log 15 509	Spez. Gew. N_2 = log 09850

durch Addition

log 57 600 = N. 37,67 mg CO_2 log 05 746 = N. 114,14 mg O_2 log 08 122 = 1,206 mg N_2

Die Addition der 3 N. ergibt das Gewicht von 100 ccm Verbrennungsgas = 153,016 mg, mit dieser Zahl werden die mgr an Co_2, O_2 und N_2 dividiert und erhält dann Gewichtsprozente.

$-\log 18\,474 = N.\ 153{,}016$	$\log 18\,474$	$\log 18\,474$
$\log 39\,126 = N.\ 24{,}617$	$\log 87\,272 = N.\ 74{,}596$	$\log 89\,648 = 0{,}787$
Gew.-% CO_2	Gew.-% O_2	Gew.-% N_2

Die Gew.-% werden berechnet nach der Prop. $\frac{153{,}016}{100} = \frac{37{,}67}{x}$ CO_2

„ „ „ „ „ „ „ $\frac{153{,}016}{100} = \frac{114{,}14}{y}$ O_2

„ „ „ „ „ „ „ $\frac{153{,}016}{100} = \frac{1{,}206}{z}$ N_2

Gewogen wurden 7,568 g Endgas. Daraus berechnet sich demnach:

	1,863 g CO_2	5,6455 g O_2	56,94 g N_2
Eingeführt	—	7,102 g O_2	44,0 mg N_2
	1,8631 g CO_2 geb.	1,4565 g O_2 verbr.	12,94 mg N_2 geb.

Die gefundenen Werte beziehen sich auf 1,1754 g Substanz.

Auf 1 g kommt also:

1,585 g CO_2 1,239 g O_2 11,06 mg N_2

Diese Zahlen wurden nach A. durch Wägung gefunden.

Nach B. ergaben sich folgende Werte:

1,584 g CO_2 1,241 g O_2 11,06 mg N_2

Die mit der gleichen Substanz ausgeführte Kontrolle ergab

nach A.:	1,592 g CO_2	1,240 g O_2	12,0 mg N_2
nach B.:	1,594 g CO_2	1,243 g O_2	12,0 mg N_2

Bei dieser zweiten Analyse wurden eingeführt 7,260 g Bombensauerstoff.

Endgas ergab a) gewogen . . . . . 7,647 g
b) gewogen und berechnet . . . 7,658 g

Es seien noch einige Werte angeführt.

Es sei noch eine Beleganalyse angeführt:

Eingeführt 7,601 g Bombensauerstoff.

Endgas a) gewogen . . . . . 8,085 g
b) gewogen und berechnet . . . . . 8,072 g

Es ergeben sich pro g Substanz

nach a)	1,4252 g CO_2	1,064 g O_2	0,9 mg N_2
nach b)	1,4225 g CO_2	1,071 g O_2	0,9 mg N_2

Kontrollanalyse.

Eingeführt 7,398 g C_2.

Endgas a) gewogen . . . . . 7,862 g
b) gewogen und berechnet . . . . . 7,862 g

Es ergeben sich:

nach a)	1,424 g CO_2	1,071 g O_2	1,4 mg N_2
nach b)	1,424 g CO_2	1,071 g O_2	1,4 mg N_2

Es geht aus den Beispielen hervor, daß die nach A. oder B. gefundenen Werte für Kohlensäure und Sauerstoff um so besser sind, je näher die Gewichte der Endgase zusammenfallen. Sind größere Differenzen vorhanden, so kommt naturgemäß der größte Fehler beim Sauerstoff zum Vorschein. Trotz des etwas längeren und umständicheren Weges über das Wägen und Berechnen des Endgases ziehen wir diesen vor, weil wir dabei von dem eventuellen Verlust von Wasser bei dem Evakuieren der Bombe unabhängig sind. Um die Genauigkeit der Methode zu beweisen, geben wir noch den von uns gefundenen Wert von reiner Saccharose pro 1 g Substanz:

gefunden	1,6223 g O_2	2,2284 g CO_2	1,4 mg N_2
berechnet aus der Formel			
$C_{12}H_{22}O_{11}$	1,6235 g O_2	2,2323 g CO_2	—

Aus diesen Beispielen geht hervor, daß die Genauigkeit der Methode für trockene Substanzen sehr zufriedenstellend und daher wohl geeignet ist, der bisher üblichen Elementaranalyse gleichgestellt zu werden, zumal der Sauerstoff ja direkt bestimmt wird.

Bei sirupösen Substanzen, z. B. Melasse, geht die Verbrennung ohne vorherige Eintrocknung glatt von statten, wenn man ein Stückchen absolut trocknes Filtrierpapier hineinsteckt. Sie ergibt auch bei Harnen von Omni- und Carnivoren gute Resultate, der Harn von Wiederkäuern bereitet jedoch manchmal Schwierigkeit, wodurch diese entsteht, ist zwar noch nicht ganz klar, hängt aber sicher mit der Zusammensetzung des verabreichten Futters zusammen. Der Harn zeigt dabei eine leichte Zersetzlichkeit, er wird unhomogen und sedimentiert. Wir benützen, um den Harn verbrennungsfähig zu machen, folgenden Weg. Ungefähr 0,5 g schwedisches Filtrierpapier wird bei 105° bis zur Konstanz getrocknet und gewogen. Für Harne haben wir zu der Calorimeterbombe ein extragroßes Platintiegelchen von ca. 12 ccm Inhalt. In dieses Tiegelchen wird ein genau passendes, sehr dünnwandiges Gläschen zur Aufnahme des Harns hineingestellt. Der Schwefel- und Phosphorgehalt würden das Platintiegelchen zerstören. Der Wiederkäuerharn wird vorher neutralisiert. Wir nehmen dazu Normaloxalsäure. Die verwandte Menge Cellulose und Oxalsäure muß dann später in Abzug gebracht werden. Zur Trocknung wird nun das Filtrierpapier, das die Form eines länglichen Streifens hat, mit dem einen Ende in den Harn hineingetaucht, mit dem anderen Ende wird es mittels eines 8 cm langen Nickelindrahtes an einer Art Galgen, der aus Eisendraht besteht und auf einem Holzblock befestigt ist, angebracht. Zur raschen Trocknung wird das Filtrierpapier so gestellt, daß es vor den schmalen Spalt eines Trockenluftapparates paßt. Es wird bei ca. 40—50° Wärme getrocknet. Sobald der Harn beinahe eingetrocknet ist, wird der Papierstreifen mit Hilfe einer feinen Pinzette zusammengefaltet und dann vollends getrocknet.

Bei der Verbrennung eiweißhaltiger Substanzen entstehen mehr oder weniger große Mengen von Salpetersäure. Zur Bestimmung der geringen Mengen dient uns die colorimetrische Methode für Nitrate. Das Verbrennungsgas und den Sauerstoff analysieren wir jetzt in dem Haldaneschen Analysen-

apparat[1]). Obwohl nur 20 ccm Gas zur Analyse genommen werden, ergibt doch die feine Calibrierung und genaue Einstellung sehr gute Resultate, wie zahlreiche Vergleichsanalysen mit dem bis jetzt benutzten Analysenapparat, der 100 ccm faßte, ergeben haben. Notwendig ist nur, daß man vor Beginn der Analyse 10 ccm reinen Stickstoff in der Sauerstoffabsorptionspipette zurückläßt. Die Absorption geschieht mit Natr. hydrosulfit von Merck. Die Dauer einer Analyse beträgt 15 Minuten.

Bei einer Verbrennungsanalyse von 80% Sauerstoff und 20% Kohlensäure betragen die größten Differenzen höchstens 2 Hundertstel, auf den Sauerstoff bezogen ein Fehler von 0,025%, auf die Kohlensäure 0,10%. Der Haldaneapparat genügt also weitaus für diese Elementaranalyse. Erwähnt sei noch, daß auch die Stickstoffbestimmung eine wertvolle Kontrolle für die Kjeldahlanalysen der Futtermittel und der Abfallprodukte bildet.

[1]) Der Apparat wird von Bleckmann & Burger, Berlin, Auguststr., angefertigt.

Zur Theorie der Desinfektion.

Von

J. Traube und **R. Somogyi.**

(Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 27. April 1921.)

In dieser Zeitschr. 98, 197. 1919 sowie in der Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 29, 286. 1920 hat der eine von uns, J. Traube, einen Beitrag zur Theorie der Desinfektion geliefert, indem er darauf hinwies, daß abgesehen von den rein chemisch wirkenden Stoffen wie H_2O_2, $KMnO_4$ usw. die meisten Desinfizientien die Bakterienzellen auf Grund ihrer quellenden bzw. irreversibel flockenden Wirkung zerstören. Damit die Stoffe wirken können, ist eine Vorbedingung, daß sie in möglichst großen Konzentrationen sich an der Grenzfläche der Bakterien ansammeln und da nach Gibbs Prinzip dies besonders für die oberflächenaktiven Stoffe der Fall ist, so ließ sich erwarten, daß die desinfizierende Wirkung in vielen Fällen der Oberflächenaktivität parallel geht.

In fast überraschender Weise zeigte sich diese Vermutung in der Reihe der Hydrocupreine und deren sogenannten Toxine bestätigt[1]). Es ergab sich, daß bei all denjenigen Bakterien und Kokken, auf welche die Stoffe jener Verbindungsklassen wirkten — es waren das im wesentlichen die grampositiven Mikroorganismen —, die Oberflächenaktivität für die Wirkung entscheidend war. Aber schon der Umstand, daß jene Alkaloidsalze auf die gramnegativen Bakterien im allgemeinen nicht wirken, zeigte, daß die Oberflächenaktivität keineswegs der einzige Faktor ist, welcher in Betracht kommt. Die Oberflächenaktivität entscheidet ja durchaus nicht in allen Fällen über die Größe der Adsorption, und ist keine Adsorption vorhanden, so kann auch keine Osmose in den Zelleib, keine Quellung oder Flockung stattfinden. Für die Größe der Adsorption (den Haft-

[1]) Vgl auch Traube, diese Zeitschr. 98, 186. 1919.

druck an der Zelloberfläche) ist aber abgesehen von anderen Faktoren in erster Linie die Art und Größe der elektrischen Ladung entscheidend.

Es lag uns nun daran, durch Wahl geeigneter Bakterien und Desinfizientien in allgemeinerer Weise als es in jener Spezialarbeit über die Wirkung der Hydrocupreine usw. geschah, dem Desinfektionsproblem näherzutreten und hat daher der eine von uns, R. Somogyi, eine Reihe von Bakterienversuchen ausgeführt und deren Ergebnisse in Beziehung gebracht zu Oberflächenaktivitäts- und Adsorptionsmessungen, die teilweise älteren Arbeiten von J. Traube entlehnt wurden[1]).

Zu unseren Untersuchungen wählten wir als Vertreter der grampositiven Mikroorganismen den Staphylokokkus und als Vertreter der gramnegativen Bakterien das Bacterium coli. Die Methodik der Versuche war die folgende: Auf schrägem Agar gezüchtete Bakterienkulturen wurden in sterilem destillierten Wasser (10 ccm) aufgeschwemmt und es wurden dann in sterilen Probierröhrchen 1 ccm der zu prüfenden Lösung mit 1 ccm der Bakterienemulsion vermischt. Man ließ alsdann bei Zimmertemperatur die Lösung eine Stunde bzw. auch 24 Stunden auf die Bakterien wirken und prüfte darauf durch Abimpfen auf Agarplatten, bei welcher Konzentration der wirksamen Lösungen eine vollständige Abtötung der Bakterien erfolgte. In gewissen Fällen, wenn es darauf ankam, möglichst konzentrierte Lösungen wirken zu lassen, wurden 0,8 ccm der Lösungen mit 0,2 ccm der Bakterienemulsion zusammengebracht. Für Lösungen, deren Oberflächenspannung noch unbekannt war, wurden mit Hilfe des Viscostagonometers Messungen jener Konstante herbeigeführt. Wir sind Herrn Dr. Langer, dem Vorsteher der Bakteriologischen Abteilung des Kaiserin Augusta-Krankenhauses in Charlottenburg, besonders dankbar für die Überlassung der Bakterienkulturen und Nährsubstanzen.

Die folgenden Tabellen enthalten die Ergebnisse unserer Versuche:

---

[1]) Hingewiesen sei an dieser Stelle auf die vortreffliche Arbeit von W. Frei, Schweiz. Arch. f. Tierheilk. 1914, H. 7, 8 u. 9. Frei hat indessen bei seinen physikalischen Erörterungen über die Desinfektion die Oberflächenspannung einstweilen beiseite gelassen, obwohl er die Bedeutung dieses Faktors sehr wohl erkannte.

Bacterium coli.

Die Abimpfung erfolgte nach einer Stunde. Vermischt wurde 1 ccm Bakterienemulsion und 1 ccm der Lösung. Das Gemisch zeigte die in Spalte 1 angegebene Normalität der Lösung. Das Zeichen — bedeutet vollkommene Abtötung, die Zeichen +, ++, +++ bedeuten ein mehr oder weniger starkes Wachstum.

Konzentration des Gemisches	n/2	n/4	n/8	n/16	n/32	n/64	n/128	n/200	n/256	n/320	n/500
Chlorwasserstoffsäure			—	—	—	—	+		++		
Schwefelsäure			—	—	—	—	+		++		
Ameisensäure			—	—	+	+++	+++				
i-Valeriansäure			—	—	+++	+++					
Caprylsäure								—			+++
Phenol		—	—	+++	+++						
m-Kresol				—	—	+++	+++				
Kaliumhydrat			—	—	—	—	++		+++		
Ammoniak		+	++	++	++						
nach 24 Stunden				+	++	++					
Diäthylamin		—	—	—	+						
Anilin			—	+++	+++	+++					
Piperidin	—	—	—	—							
Pyridin	+										
Nicotin				+	+						

Bei den folgenden Versuchen wurden 0,8 ccm der Lösung mit 0,2 ccm Bakterienemulsion vermischt.

Konzentration des Gemisches	4/10 n	2/10 n	1/10 n	1/100 n
Isoamylalkohol		—	+	
tert Amylalkohol		+++	+++	
Heptylalkohol				+++
Chloralhydrat	—			
Thymol (gesättigt)	—			
Paraldehyd		++		
Methylpropylketon		++		
Naphthalin (gesättigt)	++			

Tertiärer Amylalkohol, Paraldehyd, Methylpropylketon und Naphthalin töteten in den untersuchten Konzentrationen die Bakterien auch nach 24 Stunden nicht völlig ab.

Staphylokokkus.

Die Abimpfung erfolgte nach einer bzw. 24 und 48 Stunden. Vermischt wurde 1 ccm Bakterienemulsion und 1 ccm der Lösung. Das Gemisch zeigte die in Spalte 1 angegebene Normalität der Lösung.

Konzentration des Gemisches	n	n/2	n/4	n/8	n/16	n/32	n/64	n/128	n/200	n/256	n/320	n/512	n/640	n/1024
Chlorwasserstoffs. nach	1 Std.					—	—	—		—		+		++
Schwefelsäure	„ 1 „						—	—		—		—		+++
„	„ 24 „													+++
Trichloressigsäure	„ 1 „		—	—	—	—	—	—		—		+		+++
Ameisensäure	„ 1 „						—	—		—		—		+++
„	„ 24 „													+++
i-Valeriansäure	„ 1 „			—	—	+++								
„	„ 24 „					—	+							
Caprylsäure	„ 1 „								—		—		+++	

Konzentration des Gemisches	n	n/2	n/4	n/8	n/16	n/32	n/64	n/128	n/200	n/256	n/320	n/512
Phenol nach 1 Std.			—	—	—	+						
„ „ 24 „						—						
Kaliumhydrat „ 1 „				—	+	+	+ +		++			
„ „ 24 „					—	—	— +		++		+++	
Ammoniak „ 1 „					+	+	+ +					
„ „ 24 „					+	+	+ +					
Diäthylamin „ 1 „			—	+	++++	+						
„ „ 48 „				—	—	—						
Anilin „ 1 „				—	+	+	+					
„ „ 24 „					+	+	+					
Pyridin „ 1 „		—	++	+								
„ „ 48 „			+	+								
Piperidin „ 1 „		—	—	—	—	—	+ +					
„ „ 24 „							+ +					

Ammoniak wurde noch in folgenden größeren Konzentrationen untersucht:

	1,5 n	0,75 n	0,37 n	0,19 n
Nach 1 Stunde	++	+++	+++	+++
Nach 48 Stunden	—	—	—	—

Bei den folgenden Versuchen wurden 0,8 ccm der Lösung mit 0,2 ccm Bakterienemulsion vermischt.

		gesätt. Lösung	1/2 gesätt. Lösung	1/4 gesätt. Lösung	1/8 gesätt. Lösung	1/16 gesätt. Lösung
Benzoesäure	nach 1 Std.	—	—	+		
Salicylsäure	„ 1 „	—	—	+		
Pikrinsäure	„ 1 „	—	—	—	—	+
Zimtsäure	„ 1 „	+				
Diphenylamin gesätt.	„ 24 „	+				
Phenantren „	„ 24 „	+				
Urethan	„ 24 „	+	5/16 n-Lösung			
i-Amylalkohol	„ 1 „	+	5/16 n-Lösung			
tert. Amylalkohol	„ 1 „	+	5/16 n-Lösung			

In folgenden Tabellen seien zunächst für die Säuren diejenigen Konzentrationen zusammengestellt, welche nach einer Stunde noch abtötend auf das Bacterium coli sowie den Staphylokokkus wirken. Daneben finden sich nach früheren[1]) und jetzigen Untersuchungen von uns mittels Capillarimeter und Viscostagonometer in Milligramm die Oberflächenspannungen $\gamma = \frac{rhs}{2}$ in mg/mm bei 15° C, indem die Konstante für Wasser nach früheren Untersuchungen = 7,30 mg/mm gesetzt wurde.

---

[1]) Traube, Verhandl. d. Deutsch. physikal. Ges. **10**, 880. 1908 sowie Annalen d. Chemie u. Pharmazie **265**, 27 und Somogyi, Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. **3**, 60. 1916.

	Konz. nach 1 Stunde noch abtötend		Oberflächenspannung je in mg/mm
	Bact. coli	Staphyl.	
Chlorwasserstoffsäure	$^n/_{64}$	$^n/_{256}$	7,30 für $^n/_1$-Lösung
Schwefelsäure	$^n/_{64}$	$^n/_{512}$	7,27 „ $^n/_1$- „
Trichloressigsäure	—	$^n/_{256}$	4,82 „ $^n/_1$- „
Ameisensäure	$^n/_{16}$	$^n/_{512}$	6,84 „ $^n/_1$- „
Ivaleriansäure	$^n/_{16}$	$^n/_{16}$	5,17 „ $^n/_{16}$- „
Caprylsäure	$^n/_{200}$	$^n/_{320}$	3,47 „ $^n/_{250}$- „
Benzoesäure	—	$^1/_2$ gesätt.	6,39 „ $^1/_2$ gesätt. Lös.
Salicylsäure	—	$^1/_2$ gesätt.	6,87 „ $^1/_2$ gesätt. „
Zimtsäure	—	nicht abtötend	6,93 „ gesättigte „
Pikrinsäure	—	$^1/_8$ gesätt.	7,30 „ $^1/_8$ gesätt. „
Phenol	$^n/_{32}$	$^n/_{16}$	6,12 „ $^1/_8$ gesätt. „
m-Kresol	$^n/_{64}$	—	—

Die Tabelle zeigt zunächst, daß bei den hier vorliegenden biologischen Vorgängen die Wasserstoffionenzahl zwar auch in Betracht kommt, aber wie bei so zahlreichen biologischen Vorgängen keineswegs der allein maßgebende Faktor ist. Es braucht in dieser Beziehung nur auf das Verhalten der ungleich starken Chlorwasserstoffsäure und Schwefelsäure gegenüber dem Bacterium coli oder der Chlorwasserstoffsäure und Trichloressigsäure bzw. Schwefelsäure und Ameisensäure gegenüber dem Staphylokokkus hingewiesen zu werden. Ganz unzweifelhaft ist ein zweiter wichtiger Faktor die Oberflächenaktivität, denn ohne die große Oberflächenaktivität würde beispielsweise die Caprylsäure schwerlich eine solche Wirkung ausüben. Indessen die Oberflächenaktivität bedingt nur die größere Konzentrierung der gelösten Stoffe an den Phasengrenzflächen, besagt aber nichts in bezug auf die Größe der Adsorption, von welcher Quellung, Flockung und Osmose wesentlich bedingt werden. Damit im Zusammenhange steht die Tatsache, daß die aromatischen Säuren im Vergleich beispielsweise mit Caprylsäure weit stärker abtötend wirken, als ihrer Oberflächenaktivität entspricht, folgt doch aus früheren Untersuchungen von Freundlich und dem einen von uns, daß Stoffe der Benzolreihe gegenüber Kohle sehr erhebliche Adsorptionskoeffizienten haben. Die folgende einer älteren Arbeit[1]) entlehnte Tabelle dürfte von Interesse sein.

[1]) Traube, Verhandl. d. Deutsch. physik. Ges. 10, 901. 1908.

Traube brachte 1 g Tierkohle von Merck mit 30 ccm der 0,25 n wässerigen Lösungen bei 16—18° zusammen. Ist a die anfängliche Menge des gelösten Stoffes in der Lösung, x die adsorbierte Menge, so ist $x/a - x$ der Adsorptionskoeffizient. Daneben finden sich die capillaren Steighöhen der 0,25 n-Lösungen bei 15°. Die Steighöhe des Wassers war 91,5 mm.

	Adsorptionskoeffiz. $x/a - x$	Cap. Steighöhen der 0,25 n wässer. Lös. in mm bei 15°
Oxalsäure	0,273	90
Schwefelsäure	0,075	89,6
r-Weinsäure	0,203	89,6
Citronensäure	0,192	87,75
Bernsteinsäure	0,289	86,7
Essigsäure	0,244	85,0
Chloressigsäure	0,380	85,0
Oxyisobuttersäure	0,239	78,45
Propionsäure	0,366	75,75
Buttersäure	0,573	61,3

Die Tabelle zeigt, daß die Oberflächenaktivität (bzw. der Haftdruck im Wasser) für die Größe der Adsorption an der Kohle (den Haftdruck an Kohle) zwar mitbestimmend, aber nicht allein ausschlaggebend ist.

Freundlich[1]) brachte bei 25° C Kohle mit wässeriger Lösung von der Konzentration $c = 0{,}01$ Äqu. im Liter zusammen und stellte die von 1 g Kohle absorbierte Menge x/m der gelösten Stoffe fest.

	x/m Milliäquiv. auf 1 g Kohle
Essigsäure	0,37
Propionsäure	0,57
Buttersäure	1,04
Monochloressigsäure	0,76
Dichloressigsäure	0,74
Trichloressigsäure	0,66
Bernsteinsäure	0,30
Benzoesäure	3,27
Salicylsäure	3,04
Pikrinsäure	1,30
Sulfanilsäure	0,72
Phenol	1,86

Aus der Tabelle ergibt sich gleichfalls, daß die Oberflächenaktivität die Adsorption des gelösten Stoffes keineswegs allein

[1]) Freundlich, Capillarchemie 1909, S. 160.

bestimmt. Bemerkenswert sind die hohen Adsorptionskoeffizienten von Benzoesäure und Salicylsäure, die zweifellos für deren große desinfizierende Wirkung bedeutungsvoll sind. Pikrinsäure ist ein nicht oberflächenaktiver Stoff (vgl. Tabelle w. o.). Die Adsorption ist trotzdem sehr erheblich und die große desinfizierende Wirkung verdankt die Pikrinsäure offenbar ihrer stark eiweißflockenden Wirkung.

Während die meisten Säuren die Bakterien durch ihre stark quellenden Fähigkeiten zugrunde richten, kommt für einzelne Säuren wie Pikrinsäure sowie auch Trichloressigsäure und Salpetersäure deren flockende Wirkung in Betracht.

Schließlich sei darauf hingewiesen, daß nach der obigen Tabelle der Staphylokokkus gegen Säuren weitaus weniger widerstandsfähig ist als das Bacterium coli, welches bekanntlich Säuren hervorbringt.

Das Verhalten von Basen gegenüber den untersuchten Bakterien ergibt sich aus folgender Tabelle:

	Bact. coli abtötend		Staphyl. abtötend		Oberflächenspannung $\gamma = \frac{rhs}{2}$ mg/mm
	nach 1 Stunde	nach 24 Stunden	nach 1 Stunde	nach 24 Stunden	bei 15° C.
Kaliumhydroxyd	$^n/_{64}$	—	$^n/_8$	$^n/_{64}$	7,52 ($^n/_1$-Lösung)
Ammoniak	$^n/_4$ (nicht abt.)	—	$^n/_8$ (nicht abt.)	$^n/_{8,16}$ (abtöt.)	7,26 ($^n/_4$- „)
Diäthylamin	$^n/_8$ (abtöt.)	—	$^n/_4$ (abtöt.)	$^n/_{32}$ („)	4,44 ($^n/_4$- „)
Anilin	$^n/_8$	—	$^n/_8$ („)	$^n/_8$ („)	5,05 ($^n/_4$- „)
Piperidin	—	—	$^n/_{32}$ („)	$^n/_{32}$ („)	4,38 ($^n/_1$- „)
Pyridin	$^n/_{0,8}$ (nicht abt.)	—	$^n/_1$ („)	$^n/_1$ („)	5,72 ($^n/_8$- „)
Nicotin	—	—	—	$^n/_{16}$ („)	5,63 ($^n/_4$- „)
Eucupin	—	—	—	1:10000 (abtöt.)	—

Während gegenüber den Säuren der Staphylokokkus sich als weniger widerstandsfähig erwies als das Bacterium coli, ist gegenüber etlichen Basen das Umgekehrte der Fall. Jedenfalls ist bei kurzer Einwirkung die starke Base Kaliumhydrat wie die oberflächenaktive Base Diäthylamin gegenüber dem Bacterium coli wirksamer als gegenüber dem Staphylokokkus. Ein Vergleich von Ammoniak und Diäthylamin zeigt die Bedeutung der Oberflächenaktivität, siehe auch Piperidin Anilin und Eucupin. Daß eine große Oberflächenaktivität allein nicht genügt, um große Desinfektionswirkungen hervorzubringen, zeigt das Verhalten der sehr schwachen Base Pyridin. Ein reziprokes Verhalten von Bakterien gegenüber Säuren und Basen dürfte allgemein vorhanden sein.

In folgender Tabelle seien die früher (l. c., Verhandl. d. Deutsch. physikal. Ges.) bestimmten Adsorptionskoeffizienten

von 0,25n wässeriger Lösungen gegenüber Tierkohle und die capillaren Steighöhen (siehe l. c.) für einige Basen zusammengestellt.

	Adsorptionskoeffiz. $x/a-x$	Cap. Steighöhen der 0,25n wässer. Lös. in mm bei 15°
Wasser	—	91,5
Ammoniak	0	91,0
Diäthylamin	0,746	68,8
Piperidin	0,603	67,5
Anilin	1,252	65,5

Freundlich bestimmte die Größe x/m für Anilin (Konzentration wie oben S. 95) = 2,40. Man erkennt auch hier, wie die aromatische Base Anilin von Kohle stärker adsorbiert wird als man nach ihrer Oberflächenaktivität erwarten sollte.

Das Verhalten indifferenter Stoffe gegenüber dem untersuchten Mikroorganismen ergibt sich aus folgender Zusammenstellung:

	Bact. coli nach 1 Stunde	Staphyl. nach 1 Stunde	Oberflächenspannung. $\gamma = \frac{rhs}{2}$ mg mm bei 15° C.
tert. Amylalkohol	$^n/_8$ (nicht abtötend)	$^n/_8$ (nicht abtötend)	4,350 ($^n/_4$-Lösung)
i-Amylalkohol	$^n/_8$ (abtötend)	$^n/_8$ („ „)	3,050 ($^n/_4$-Lösung)
Heptylalkohol	$^n/_{100}$ (nicht abtötend)	—	4,14 ($^n/_{100}$- „)
Benzylalkohol	—	0,8 (gesätt. abtötend)	4,56 (gesätt. „)
Thymol	0,8 (gesätt. abtötend)	—	4,87 („ „)

Ein Vergleich der Wirkungen beispielsweise des tertiären Amylalkohols und des i-Amylalkohols zeigten, daß die Oberflächenaktivität auch bei den indifferenten Stoffen eine Rolle spielt, aber der Umstand, daß beispielsweise der stark oberflächenaktive Heptylalkohol in $^n/_{100}$-Lösung trotz der geringen Oberflächenspannung keine desinfizierende Wirkung zeigt, läßt erkennen, daß eine oberflächenaktive Verbindung nur dann sehr wirksam ist, wenn der Verbindung der Charakter einer Säure oder Base innewohnt. Andere würden sagen: Wenn sie Wasserstoffionen oder Hydroxylionen enthält, wir aber sagen dieses absichtlich nicht[1]). Für Stoffe wie Urethan, Paraldehyd, Methylpropylketon und Proprionitril konnte trotz teilweise erheblicher Oberflächenaktivität in der untersuchten Konzentration (s. Tabelle w. o.) keine desinfizierende Wirkung nachgewiesen werden. Die folgende Tabelle enthält die früher (s. l. c.,

[1]) Vgl. die folgende Mitteilung: Nochmals die Wasserstoffionen.

Verhandl. d. Deutsch. physikal. Ges.) bestimmten Adsorptionskoeffizienten 0,25 n wässeriger Lösungen gegenüber Tierkohle und die capillaren Steighöhen bei 15° in mg/mm (Wasser-Steighöhe = 91,5 mm).

	Adsorptionskoeffiz. $x/a-x$	Cap. Steighöhen der 0,25 n-Lösung bei 15° C
Äthylalkohol	0,136	84,0
Acetaldoxim	0,289	83,5
Aceton	0,288	80,85
Urethan	0,428	79,35
Proprionnitril	0,405	77,1
Methylacetat	0,471	75,0
Methyläthylketon	0,330?	72,85
Äthylacetat	0,543	62,8
Methylpropylketon	0,701	58,2
tert. Amylalkohol	0,480	54,5
i-Amylalkohol	0,786	37,4

Man erkennt, bis zu welchem Grade Oberflächenspannung und Adsorption parallel gehen.

Aus allem ergibt sich, daß die weitgehende Parallelität der desinfizierenden Wirkung und der Oberflächenaktivität, wie sie sich in den Arbeiten des einen von uns, Traube (s. w. o.), über die Hydrocupreine und deren Toxine ergeben hat[1]), offenbar nur dann besteht, wenn man die Wirkung verwandter Verbindungen, etwa der Amine, Fettsäuren usw. auf Bakterien vergleicht. Wenn es sich aber um heterogene Stoffe handelt, so kommt außer der Oberflächenaktivität in Betracht die Adsorptionsgröße, welche keineswegs in allen Fällen der Oberflächenaktivität parallel geht. Von besonderer Bedeutung ist es, ob eine Säure, Base oder ein indifferenter Stoff vorliegt, wissen wir doch, daß die Adsorption je nach der elektrischen Ladung des Bacteriums hiervon abhängt und daß starke Quellungen nur durch Säuren oder Basen hervorgerufen werden. Andererseits ist auch auf die eiweißflockenden Wirkungen einiger der untersuchten Stoffe Rücksicht zu nehmen.

Zusammenfassung.

Im Anschluß an frühere Arbeiten wurde durch Versuche am Staphylokokkus und Bacterium coli gezeigt, daß, wenn

[1]) Vgl. auch Traube, diese Zeitschr. 98, 186. 1919.

man von den direkt chemisch wirkenden Desinfizientien absieht, im allgemeinen physikalische Kräfte für die Desinfektionswirkung entscheidend sind, wie Oberflächenaktivität, Adsorption, das elektrische Potential, quellende, flockende und osmotische Wirkungen. Von den zahlreichen Einzelheiten dieser Abhandlung sei hervorgehoben, daß oberflächenaktive Stoffe nur dann eine größere bactericide Wirkung ausüben, wenn sie sauer oder basisch sind oder Salze bilden, welche Kationen oder Anionen abscheiden. Die Feststellung, daß das Bacterium coli gegen Basen weniger widerstandsfähig als der Staphylokokkus, der Staphylokokkus gegen Säuren dagegen empfindlicher als das Bacterium coli ist, dürfte aus kolloid-chemischen Gründen in bezug auf die Reziprozität der Wirkungen von Säuren und Basen eine allgemein zutreffende Regel sein.

Wirkung von Säuren auf die Hefegärung.

Von

R. Somogyi.

(Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 27. April 1921.)

In Ergänzung der vorhergehenden Mitteilung wurde von mir die Wirkung einiger Säuren auf die Hefe untersucht.

Schon früher haben Neuberg und Czapski[1]) sowie Neuberg und M. Ehrlich[2]) den Einfluß verschiedener Säuren auf die Umsetzung des Zuckers mit frischer Hefe sowie bei zellfreier Gärung eingehend untersucht. Sie haben für Essigsäure, Weinsäure, Apfelsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Ameisensäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure und Brenzschleimsäure in genauen Eudiometerversuchen eine gärungshemmende Wirkung festgestellt. Das gleiche haben Neuberg und M. Ehrlich für aliphatische und cyclische Alkohole (Methyl-, Propyl-, Isopropyl-, n-Butyl-, sek. Butyl-, Amyl-, Allyl-, Cetyl-, Furfur-, Benzyl- und Phenyläthylalkohol) festgestellt.

Die Befunde dieser Autoren kann ich durchaus bestätigen.

Meine Versuche wurden bei Zimmertemperatur einfach in der Weise ausgeführt, daß in einer Anzahl der bekannten Apparate von Lohnstein, welche für Zuckerbestimmungen im Urin in der ärztlichen Praxis vielfach Anwendung finden, je 0,5 ccm der zu untersuchenden Lösung mit 0,5 ccm einer 10proz. Traubenzuckerlösung und 0,5 ccm einer 10proz. Reinhefeemulsion gemischt und nach bestimmten Zeitintervallen die vergorene Zuckermenge aus der Steighöhe des Quecksilbers in Graden der empirischen Zuckerskala bestimmt wurden. Die Kontrollbestimmungen und die Eichung der Apparate erfolgte, indem die Lösung durch eine

[1]) C. Neuberg und L. Czapski, diese Zeitschr. **67**, 50. 1914.

[2]) C. Neuberg und M. Ehrlich, diese Zeitschr. **101**, 267. 1920.

gleiche Wassermenge ersetzt wurde. Um die Fehler auszuschalten, welche sich aus den Schwankungen der Zimmertemperatur ergaben, wurden täglich Kontrollbestimmungen bei gleicher Temperatur ausgeführt. Die Reinhefe stellte mir in liebenswürdigster Weise Herr Professor Henneberg vom Institut für Gärungsgewerbe zur Verfügung[1]).

In der folgenden Zusammenstellung finden sich in der ersten Spalte die Konzentrationen der Lösungen. Die weiter angegebenen Zahlen bedeuten die prozentualen Hemmungen der Gärung. Die Zahl 66 besagt beispielsweise, daß bei einer Vergärung von 100% Zucker mittels reiner Hefe und Wasserzusatz der betreffenden Säurelösung 34% vergoren wurden und somit die Hemmung der Gärwirkung durch die betreffende Säurelösung 66% betrug.

Prozentuale Hemmungen der Hefegärung.

Konzentrationen	n/6	n/30	n/150	n/300	n/480	n/600	n/1500
Chlorwasserstoffsäure	100	—	50	30	—	30	5
Salpetersäure	—	75	30	20	—	—	10
Schwefelsäure	—	60	30	20	—	0	0
Oxalsäure	—	90	20	10	—	—	0
Phosphorsäure	—	55	25	0	—	—	—
Weinsäure	—	80	50	10	—	—	0
Milchsäure	—	30	15	10	—	—	—
Chloressigsäure	—	100	65	30	—	—	—
Ameisensäure	—	100	50	40	—	—	—
Essigsäure	—	100	30	—	0	—	—
Isobuttersäure	100	85	30	10	—	—	—
Isovaleriansäure	—	75	30	25	—	—	0
Caprylsäure	—	—	—	—	50	—	—

Man erkennt auch hier wieder wie bei so zahlreichen biologischen Wirkungen der Säuren, daß keineswegs nur die Zahl der Wasserstoffionen maßgebend ist. Zweifellos ist auch hier die Oberflächenaktivität ein Faktor, welcher in erheblichem Maße mitspricht, vor allem ferner die Adsorptionsfähigkeit sowie die quellenden und flockenden Eigenschaften der Säuren. Man ver-

[1]) Vgl. die Mitteilung von Windisch, Henneberg und Dietrich, diese Zeitschr. **107**, 172. 1920. Die genannten Forscher haben nach einer Methode, welche der meinigen vorzuziehen ist, die Wirkung von Amylalkohol, Oktylalkohol und Nonylsäure auf die Hefe untersucht und gefunden, daß die schädigende Wirkung der Oberflächenaktivität parallel geht. Für das Ziel, welches ich verfolgte, genügte indessen der von mir gewählte Lohnsteinsche Apparat.

gleiche auch die Säurereihe, welche Traube und Marusawa[1]) in bezug auf die Keimfähigkeit der Gerste feststellte. Hier erwies sich als giftigste Säure die Isovaleriansäure.

Schließlich wurden noch einige Messungen mit dem stark oberflächenaktiven i-Amylalkohol und Heptylalkohol und dem weniger oberflächenaktiven tertiären Amylalkohol ausgeführt. Die Gärungshemmung war für i-Amylalkohol in $^n/_{12}$-Lösung = 35%, für tertiären Amylalkohol 25%, Heptylalkohol hemmte die Gärung in $^n/_{300}$-Lösungen nur um 10%. Die gärungshemmende Wirkung dieser indifferenten oberflächenaktiven Stoffe ist daher im Einklang mit den Bakterienversuchen weitaus geringer als diejenige entsprechender oberflächenaktiver Säuren.

Zusammenfassung.

Die schädigende Wirkung der Säuren ist nicht allein auf die Zahl der Wasserstoffionen zurückzuführen, sondern es kommen auch die Oberflächenaktivität sowie die quellenden und flockenden Wirkungen der Säuren in Betracht.

[1]) Traube und Marusawa, Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. 2, 370. 1915.

Quellung von Fibrin durch Säuren.

Von

R. Somogyi.

(Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 27. April 1921.)

Das Studium der Quellungserscheinungen von Kolloiden durch Säuren ist nach verschiedensten biologischen wie auch technischen Richtungen von Bedeutung.

Für einzelne Säuren wie beispielsweise Salzsäure hat man seit längerer Zeit insbesondere der Gelatine gegenüber die Quellungskurven in der Abhängigkeit von der Konzentration untersucht. Es ergab sich dabei ein Maximum der Quellung bei einem Säuregehalt von annähernd 0,02 Mol im Liter. Traube und Köhler[1]) haben sodann für eine größere Anzahl von Säuren die Quellung der Gelatine untersucht. Es wurde allgemein ein solches Quellungsmaximum festgestellt, doch war die Größe der Quellung sehr verschieden. Die Reihenfolge der Säuren in bezug auf die Größe der Quellung war etwa die folgende:

Oxalsäure > Chloressigsäure > Chlorwasserstoffsäure > Dichloressigsäure = Weinsäure = Phosphorsäure > Citronensäure > Trichloressigsäure > Salpetersäure > Essigsäure > Schwefelsäure > Buttersäure > i-Valeriansäure.

Ob die Reihenfolge der Säuren bei nochmaligen Untersuchungen nicht doch irgendwelche Verschiebungen erleidet, mag dahingestellt bleiben, sicher ist indessen, daß Säuren wie Schwefelsäure, Trichloressigsäure und insbesondere die oberflächenaktiven höheren Fettsäuren weitaus geringere Quellungen erzeugen als Chlorwasserstoffsäure, Chloressigsäure, Weinsäure, Phosphorsäure usw.

---

[1]) Traube und Köhler, Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. **2**, 62. 1915.

Es war nun von Interesse, zu untersuchen, ob sich auch für andere Kolloide im wesentlichen dieselbe Reihenfolge der Säuren ergibt.

Nach dem, was in der Gerbereitechnik über die Säurequellung der tierischen Haut bekannt ist, scheint hier im wesentlichen dieselbe Quellungsreihe wie für Gelatine zu bestehen.

Zu meinen Untersuchungen wählte ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Traube das Fibrin in Form eines leider nicht ganz reinen Präparates von Merck.

Martin Fischer hat in seiner bekannten Studie über das Ödem (Steinkopf, Dresden) nach einer einfachen Methode die Quellung des Fibrins durch Chlorwasserstoffsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure und Essigsäure untersucht[1]). Die Methodik bestand darin, daß eine bestimmte Menge gemahlenen Fibrins mit Wasser sowie Säuren von verschiedener Konzentration in gleichweiten Reagenzgläsern in gleichmäßiger Weise in Berührung gebracht wurde, und es wurde alsdann nach einer bestimmten Stundenzahl die Höhe der gequollenen Fibrinsäule gemessen.

Bei meinen Versuchen brachte ich stets 4 ccm gleich fein gemahlenen Fibrins mit 20 ccm Wasser bzw. Säurelösung zusammen, so daß die Fibrinmasse möglichst gleichmäßig mit Flüssigkeit durchtränkt war, und stellte nach 24 sowie 48 Stunden die Höhe der Fibrinsäule fest. Ein Umrühren der Masse brachte keine besonderen Vorteile.

Die Methode ist roh, und ich sehe daher von der Veröffentlichung der gesamten Zahlentabellen ab, indem nur bemerkt werden mag, daß der Gang der Quellung meist für verschiedenste Konzentrationen der Säurelösungen von $^{n}/_{80}$ bis 2n, 4n und 6n untersucht wurde.

Das Quellungsmaximum wurde für verschiedene Säuren nicht bei derselben Konzentration gefunden, indessen mein Fibrinpräparat war nicht rein genug, um jene Konzentrationen sowie den Kurvenverlauf scharf genug bestimmen zu können. Ich begnüge mich daher damit, in folgender Zusammenstellung die Maximalhöhen der gequollenen Fibrinsäule in Millimetern anzugeben, welche das Fibrin nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur erreichte, sofern nicht gerührt wurde.

---

[1]) Herr Prof. Traube teilte mir mit, daß derselbe Autor nach einem Vortrage, welchen er in der Physiologischen Gesellschaft in Berlin vor einigen Monaten hielt, auch noch einige andere Säuren untersucht hat.

	Maximalhöhe der Fibrinsäule in mm
Chlorwasserstoffsäure	70—80
Salpetersäure	35—40
Schwefelsäure	40—45
o-Phosphorsäure	80
Oxalsäure	70—80
Milchsäure	75—90
Bernsteinsäure	50
Weinsäure	85
Chloressigsäure	70—80
Ameisensäure	85—95
Essigsäure	80—90
Isobuttersäure	50
Isovaleriansäure	40

Man erkennt im großen und ganzen dieselbe Reihenfolge wie für die Gelatine: Chlorwasserstoffsäure, Oxalsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Chloressigsäure, Phosphorsäure, Milchsäure und Weinsäure quellen sehr stark, Schwefelsäure, Salpetersäure, i-Buttersäure, i-Valeriansäure dagegen weitaus weniger.

Biologisch ist besonders interessant das große Quellungsvermögen der Milchsäure, man denke an die Theorien der Muskelquellung; die starken Quellungen durch Ameisensäure sind ja infolge der Insektenquellung hinlänglich bekannt, und das starke Quellungsvermögen der Chlorwasserstoffsäure ist für die Vorgänge im Magen, wie Professor Traube gezeigt hat[1]), von Bedeutung.

Zusammenfassung.

Versuche nach der Methode von Martin Fischer, die Quellung von Fibrin für eine größere Anzahl von Säuren festzustellen, führte zu dem Ergebnisse, daß sich im wesentlichen dieselbe Reihenfolge ergab wie für Gelatine. Säuren wie Chlorwasserstoffsäure, Oxalsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Chloressigsäure, Phosphorsäure, Milchsäure und Weinsäure ergaben starke Quellungen, Schwefelsäure, Salpetersäure, namentlich aber i-Buttersäure und i-Valeriansäure geringe Quellung.

Von biologischer Bedeutung ist insbesondere das starke Quellungsvermögen der Milchsäure (Muskelquellung), Chlorwasserstoffsäure (Quellungen im Magen) und Ameisensäure (Insektenstiche).

[1]) Traube, diese Zeitschr. **107**, 295. 1920.

Ein neues Viscostalagmometer zur Bestimmung der Oberflächenspannung und Reibung für Flüssigkeiten von verschiedenster Reibung.

Von

J. Traube.

(Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 27. April 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Das durch beistehende Abbildung dargestellte Viscostalagmometer, hergestellt von der Firma C. Gerhardt in Bonn, ist ganz besonders empfehlenswert.

Es ist ein einfaches Stalagmometer mit 4—5 eingeschliffenen Capillarröhrchenaufsätzen von verschiedener Länge und Weite. Je nach der Reibung der Flüssigkeit setzt man eines der Röhrchen auf das Stalagmometer. Nr. 1 wird für Wasser gewählt, Nr. 4 bez. 5 für Glycerin oder ein zähes Öl, und Nr. 2 und 3 werden für Flüssigkeiten von mittlerer Reibung verwandt.

Das Viscostalagmometer ist für Messungen der Oberflächenspannung wie der Viscosität gleich gut geeignet. Es hat zunächst den besonderen Vorteil vor dem bisher angewandten Stalagmometern, daß man durch die Wahl des aufzusetzenden Röhrchens die Abtropfzeit bzw. Ausflußzeit so regeln kann, wie man es möchte, dann aber ist es besonders wertvoll, daß am eigentlichen Abtropf- bzw. Ausflußapparat eine Capillarröhre vermieden wird und somit Verstopfungen ausgeschlossen sind. Endlich erfolgt die Reinigung sehr bequem und schnell, indem man Wasser usw. mit Hilfe der Pumpe aufsaugt, dann das obere Röhrenstück entfernt, so daß die zur Reinigung benutzte Flüssigkeit schnell aus dem Apparate ausfließt.

Für Viscositätsmessungen kommt noch besonders in Betracht, daß man weit vollkommener als mit den gewöhnlichen Apparaten der Technik die auf Wasser bezogene Reibungskonstante messen kann. Hat man eine sehr zähe Flüssigkeit, so bestimmt man nicht etwa die Ausflußzeit für diese Flüssigkeit und Wasser mit Hilfe desselben Capillarröhrchenaufsatzes, sondern man bestimmt zunächst mit Hilfe des engsten Röhrenaufsatzes die relativen Ausflußzeiten von Wasser und einer etwa 2fach zäheren Standardflüssigkeit. Diese Standardflüssigkeit wird dann mit Hilfe des zweitengsten Röhrchenaufsatzes mit einer noch zäheren Flüssigkeit verglichen usf. So kann man leicht durch Multiplikation der betreffenden Quotienten die Viscosität einer sehr zähen Flüssigkeit, auf Wasser bezogen, sehr genau bestimmen. Erfolgt die Bestimmung der Reibungskonstante bei Temperaturen, welche irgendwelcher Zimmertemperatur entsprechen, so genügt es, wenn man für Wasser und die Standardflüssigkeiten für mehrere Zimmertemperaturen ein für allemal die Ausflußzeiten bestimmt hat. Für Viscositätsmessungen bei entfernteren Temperaturen ist der Apparat in größerer Ausführung mit einem Wassermantel zu umgeben. Auf Verlangen liefert die genannte Firma auch diese Apparate.

Abb. 1.

Zusammenfassung.

Das Viscostalagmometer[1]) stellt einen besonders einfachen Apparat dar für Messungen der Oberflächenspannung und Reibung von Flüssigkeiten von sehr verschiedener Zähigkeit.

[1]) Das Viscostalagmometer ist nicht zu verwechseln mit dem Viscostagonometer, welches neben dem ersteren Apparate seine Bedeutung behält.

Nochmals die Wasserstoffionen.

Von

J. Traube.

(Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 27. April 1921.)

Ohne nochmals auf den Ausgangspunkt dieser Betrachtungen, die besondere Frage der Art und Weise der Fermentwirkungen[1]), zurückzukommen, scheint mir die Wasserstoffionenfrage für die allgemeine physikalische Chemie, wie auch insbesondere für die biologischen Wissenschaften bedeutsam genug, um meinen Standpunkt hier nochmals darzulegen.

Meine Betrachtungen mögen ausgehen von den vorhergehenden Mitteilungen von Traube und Somogyi sowie Somogyi.

Traube und Somogyi stellten fest, daß indifferente, oberflächenaktive Stoffe, wie selbst i-Amylalkohol und Heptylalkohol schwache Desinfizientien gegenüber den untersuchten Bakterien sind. Säuren und Basen wirken dagegen weitaus stärker desinfizierend.

Dasselbe, was für die Bakterienzelle gilt, trifft auch zu für die Hefezelle und zahlreiche andere Zellen.

Erinnert sei an die Versuche von Führer und Neubauer[2]) sowie von mir[3]) über die Zerstörung roter Blutkörperchen. Um rote Blutkörperchen durch einen so stark oberflächenaktiven indifferenten Stoff wie i-Amylalkohol augenblicklich zu zerstören, bedurfte man einer Konzentration der wässerigen Lösung, welche die capillare Steighöhe 49 mm ergab, wenn Wasser in demselben Capillarrohr auf 91,5 mm stieg. Dahingegen genügte von wässeriger Essigsäurelösung bereits eine minimale Konzentration, welche der capillaren Steighöhe —91,0 mm entsprach, und für andere Säuren wie auch Basen ergaben sich ähnliche Konzentrationen.

Als Ursache für die Zerstörung von Zellen kommen nun

---

[1]) Traube, diese Zeitschr. **107**, 295. 1920 und L. Michaelis, ebenda **111**, 105. 1920.

[2]) Führer und Neubauer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **56**, 333. 1907.

[3]) Traube, diese Zeitschr. **10**, 375. 1908.

aber in erster Linie die Quellung und Flockung in Betracht. Über die Quellung gibt uns ja u. a. die vorhergehende Arbeit von Somogyi Auskunft. Oberflächenaktive, indifferente Stoffe wirken zwar auch quellend[1]), aber der Quellungsgrad ist unbedeutend gegenüber den Quellungsmaximis, welche durch sehr geringe Mengen von Säuren und Basen eintreten. Der große Unterschied, welchen Säuren und Basen gegenüber den indifferenten Nichtleitern in bezug auf das Flockungsvermögen zeigen, ist ja hinlänglich bekannt.

Daß Säuren und Basen somit auf Zellen der verschiedensten Art in viel höherem Grade zerstörend wirken müssen als im allgemeinen indifferente Nichtleiter, gleichgültig ob oberflächenaktiv oder nicht, ist ja hiernach ohne weiteres verständlich, und ebenso ist es verständlich, daß Säuren und Basen auch gegenüber den Salzen eine Ausnahmestellung einnehmen. Hier gilt ja die Quellungs- und Flockungsreihe von Hofmeister und Spiro; wir wissen, daß selbst die quellenden Eigenschaften von Ionen wie CNS oder K zurücktreten gegen Säure- und Alkaliwirkung, daß aber andererseits die Wirkungen auf Zellen groß genug sind, um schädigend zu wirken, wenn man nicht gleichzeitig antagonistisch wirkende Ionen wie SO_4 bzw. Ca einwirken läßt.

Nun begeht man vielfach den Fehler, wenn man das Wort Säure oder Base gebrauchen sollte, das Wort: Wasserstoffion bzw. Hydroxylion zu setzen. Das ist nach meiner Ansicht unzulässig. Gewiß ist in bezug auf die Quellungs- und Flockungsvorgänge sowie die davon abhängigen mannigfaltigen Zerstörungen von Zellen die Zahl der Wasserstoffionen bzw. Hydroxylionen einer der in Betracht kommenden Faktoren, aber andere Faktoren kommen jedenfalls mit in Betracht. Gewiß wäre es sehr schön, wenn die Dinge so einfach lägen, wie man vielfach angenommen hat, dann wäre es angängig, nach der bekannten Methodik die Zahl der Wasserstoffionen zu bestimmen, und man hätte ein quantitatives Maß der Säurewirkung. Aber ebenso wie man sich in der reinen physikalischen Chemie nach den Untersuchungen von Snethlage[2]) hat überzeugen müssen, daß für die katalytische

[1]) Shryver, Proc. of the roy. soc. of London **83**, 96. 1910 und **87**, 366. 1914; Traube und Köhler, Intern. Zeitschr. f. physik.-chem. Biol. **2**, 42. 1915 und Heilbrunn, Biol. Bull. **29**, 149. 1915 und **39**, 307. 1920.

[2]) Snethlage, Inaug.-Diss. Karlsruhe 1913 und Zeitschr. f. physikal. Chemie **90**, 1. 1915; vgl. meine Bemerkungen diese Zeitschr. **107**, 297. 1920.

Wirkung der Säuren (Zuckerinversion usw.) nicht nur die Wasserstoffionen, sondern auch in hohem Maße die Anionen und die undissoziierten Molekeln in Betracht kommen, ebenso sind bei den biologischen Vorgängen, wie Zellzerstörung und Katalyse, insbesondere auch Fermentkatalyse nicht nur die Wasserstoffionen, sondern auch die Anionen und die undissoziierten Molekeln beteiligt. Und daher scheint es mir nicht richtig zu sein, wenn wir in der bekannten Monographie von Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, Springer 1914, auf S. 1917 lesen:

„Da sich herausgestellt hat, daß für alle chemischen und biologischen Vorgänge, die von der Acidität der Lösung beeinflußt werden, nur die aktuelle Acidität (d. h. die durch die Wasserstoffzahl definierte Acidität) maßgebend ist, so erhellt die überwiegende Bedeutung derselben."

Nach meiner Ansicht ist es viel richtiger, wieder die alte Titrationsacidität und Titrationsalkalität mehr in den Vordergrund der biologischen Betrachtungen zu stellen (vgl. meine Ausführungen, diese Zeitschr. *107*, 298. 1920). Man kommt weiter damit, wenn man eine Körperflüssigkeit wie das Blut als ein amphoteres Milieu ansieht, welches in normalem Zustand und gewissen pathologischen Fällen eine recht verschiedene Acidität und Alkalität besitzt, als wenn man sich mit der Wasserstoffionenzahl des Blutes begnügt. Auf die Bedeutung der Oberflächenaktivitätstitrimetrischen Methode[1]) wurde bereits hingewiesen. Nach meinen neueren Erfahrungen scheint mir allerdings die Verwendung der von Windisch und Dietrich (siehe l. c.) vorgeschlagenen Undecylsäure an Stelle der Isovaleriansäure nicht unbedenklich. Die Nonylsäure ist, wenn man eine größere Empfindlichkeit anstrebt, besser geeignet.

Zusammenfassung.

Es wird nochmals darauf hingewiesen, daß man bei biologischen Vorgängen die Bestimmung der Wasserstoffionenzahl allzu sehr in den Vordergrund gestellt hat. Bei der Beurteilung der Säure- und Alkaliwirkung kommen noch andere Faktoren in Betracht, die man nicht vernachlässigen darf.

[1]) Traube, Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. **1**, 370 u. 389. 1914 und Münch. med. Wochenschr. 1914, Nr. 31, S. 1713; ferner Windisch und Dietrich, diese Zeitschr. **97**, 35. 1919 und **100**, 130. 1919.

Experimentelle Beiträge zur Theorie der Narkose.

Von

J. Traube und **P. Klein.**

(Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 27. April 1921.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In verschiedenen Abhandlungen[1]) wurde von dem einen von uns, J. Traube, eine Theorie der Narkose veröffentlicht, welche in ihren Grundzügen bekannt sein dürfte. Es wurde darauf hingewiesen, daß die Narkotica wie Alkohole, Äther, Ester usw. im allgemeinen oberflächenaktiv sind, daß derartige Stoffe entsprechend dem Prinzip von Gibbs sich an der Phasengrenzfläche ansammeln und damit die Chance gegeben ist, daß gerade solche Stoffe schnell in die Zellen eindringen. Aber mit dem Nachweise, daß solche Stoffe schnell an den Ort ihrer Wirksamkeit gelangen, ist natürlich noch nicht der Narkosevorgang erklärt. Es konnte indessen unter Hinweis auf die Arbeiten anderer Forscher[2]) gezeigt werden, daß oberflächenaktive Stoffe die Fähigkeit haben, Oxydationsvorgänge und andere chemische Prozesse zu hemmen, Flockungsvorgänge zu beschleunigen bzw. herbeizuführen, ebenso die Quellung zu erhöhen[3]), vor allem aber auch

[1]) Vgl. u. a. J. Traube in Arch. f. d. ges. Physiol. **153**, 276. 1913; **161**, 530. 1915 und **176**, 70. 1919; Berl. klin. Wochenschr. 1915, Nr. 14.

[2]) Vgl. die Literatur in obiger Arbeit, Arch. f. d. ges. Physiol. **153**, 276. 1913.

[3]) Shryver, Proc. Royal Soc. London **83**, 96. 1910 und **87**, 366. 1914; Traube und Köhler, Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. **2**, 42. 1915. Der von Shryver beim Natriumcholatgel sowie von Traube und Köhler bei Gelatine erbrachte Nachweis, daß die indifferenten oberflächenaktiven Narkotica quellend wirken, wurde in neuester Zeit nach einer recht interessanten Methode von Heilbrunn (Biol. Bull. **29**, 149. 1915 und **39**, 307. 1920) beim lebenden Protoplasma bestätigt. Diese Feststellungen sind sehr

die bioelektrischen Potentiale zu schwächen. Oberflächenaktivität und katalytische Beeinflussung gehen im großen und ganzen parallel, ebenso wie Oberflächenaktivität und osmotische Fähigkeit, und es ergab sich so ein einigermaßen abgerundetes Bild einer Narkosetheorie, welche ja auch vielfach Anerkennung gefunden hat[1]).

In den späteren Mitteilungen wurde dann immer mehr der Haftdruck an Stelle der Oberflächenaktivität in den Vordergrund gestellt. Die Oberflächenaktivität war nur eine von zahlreichen physikalischen Konstanten wie beispielsweise auch die Löslichkeitsbeeinflussung, der Dampfdruck usw., welche es ermöglichten, den Haftdruck zu bestimmen. In Fällen wie beispielsweise bei Chloroformlösungen, wo die Messung der Oberflächenaktivität versagte, aus Gründen, auf welche näher eingegangen wurde[2]), ward darauf hingewiesen, daß es sich auch bei derartigen Narkoticis par excellence um Stoffe von sehr geringem Haftdruck am Wasser handle, die das Bestreben haben, sich nach Gibbs' Prinzip schnell in der Oberfläche anzusammeln und dementsprechend schnell in die Zellen einzudringen. Nun ist aber neuerdings von verschiedenen Seiten darauf hingewiesen worden, daß eine große Klasse von Verbindungen, und zwar vor allem die eigentlichen Halogenalkyle wie Tetrachlorkohlenstoff, Perchloräthan usw. sowie die Kohlenwasserstoffe wie Amylen, Benzol usw. und zahlreiche andere Verbindungen in klarer wässeriger Lösung eine erhebliche hämolytische und narkotische Wirksamkeit entfalten, obwohl bei stalagmometrischen und viscostagonometrischen Messungen sich Konstanten ergeben, welche sich von derjenigen des Wassers gar nicht oder äußerst wenig unterscheiden.

---

wichtig in Hinsicht auf die von Traube bekämpfte Ansicht von Höber u. a., wonach das Wesen der Narkose auf eine Permeabilitätsverminderung zurückzuführen sein soll, während der eine von uns, Traube, auf Grund der quellenden Wirkung der oberflächenaktiven Stoffe gerade das Gegenteil annimmt (siehe l. c.). — Auf die neueren Ausführungen des Herrn Knaffl-Lenz in dieser Zeitschr. **105**, 88. 1920, zur Narkosetheorie soll nicht näher eingegangen werden. Herr Knaffl-Lenz macht sich die Kritik anderer Arbeiten etwas leicht auf Grund von Versuchen, die höchst angreifbar sind. Es sei hingewiesen auf die Ausführungen Traubes, Arch. f. d. ges. Physiol. **176**, 72 u. f. 1919.

[1]) Vgl. Winterstein, Die Narkose. Springer, Berlin 1919.

[2]) Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. **153**, 307. 1913.

Der eine von uns, J. Traube, gibt gern zu, daß er bei einem Stoffe wie etwa Tetrachlorkohlenstoff infolge der mangelnden Oberflächenaktivität der wässerigen Lösung angenommen hatte, daß ein derartiger Stoff in Wasser so gut wie unlöslich sei. Diese Annahme war aber nicht mehr aufrechtzuerhalten, nachdem von Joachimoglu[1]) sehr erhebliche hämolytische Wirkungen wässeriger Chlorkohlenstofflösungen und, wie mir von demselben Forscher sowie auch von H. Fühner[2]) mitgeteilt wurde, auch erhebliche narkotische Wirkungen herbeigeführt wurden.

Daher mußte Wasser auch derartige Stoffe gelöst enthalten, und es gelang uns zunächst mit Hilfe von Lenards Methode der Zerstäubungselektrizität[3]) diesen Nachweis zu führen. Hierüber soll aber erst später berichtet werden.

Wenn aber Chlorkohlenstoff in Wasser gelöst war, so lag der Gedanke nahe, daß eine durchsichtige, dem bloßen Auge verborgene Emulsion von Amikronen bzw. Submikronen vorlag.

Der eine von uns, Traube, erinnerte sich an ältere Versuche, welche von ihm mit Alkaloiden ausgeführt worden waren[4]), welche diese Hypothese nahelegten. Frisch hergestellte wässerige Atropinlösung zeigte eine starke Oberflächenaktivität, erhebliche Giftwirkung und zahlreiche winzige Submikronen mit schnellster Brownscher Bewegung. Ältere Lösungen zeigten die Oberflächenspannung des Wassers, eine ganz minimale Giftwirkung und nur größere unbewegliche Submikronen. Ein Tropfen Alkali machte den Prozeß reversibel. Die Vergrößerung der Teilchen führte somit zur Oberflächeninaktivität. Ganz entsprechende Beobachtungen machten Windisch und Dietrich[5]) bei höheren Fettsäuren, wie Nonylsäure, Caprinsäure und Undecylsäure. Auch hier gab es eine oberflächenaktive und oberflächeninaktive Form der Fettsäure. Die oberflächeninaktive Säure konnte oberflächenaktiviert werden durch Zusatz einiger Tropfen Salzsäure.

Es war danach sehr wohl möglich, daß derartige indifferente

[1]) Joachimoglu, diese Zeitschr. **103**, 243. 1920.

[2]) Siehe die Anmerkung am Schlusse dieser Mitteilung.

[3]) Vgl. darüber J. Traube, Ann. d. Physik **62** (IV), 165. 1920.

[4]) Traube, diese Zeitschr. **42**, 470. 1912 sowie Traube und Onodera, Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. **1**, 35. 1914.

[5]) Windisch und Dietrich, Kolloid-Zeitschr. **26**, 193. 1920.

Narkotica wie Chlorkohlenstoff, Chloroform usw. in der wässerigen Lösung in Form von Submikronen enthalten waren, doch war es von vornherein fraglich, ob hier dasselbe gelingen würde wie bei Basen und Säuren. Das ist in der Tat auch nicht gelungen[1]), aber es gelang uns mit voller Sicherheit den Nachweis zu führen, daß alle die hier in Betracht kommenden Narkotica, die Halogenalkyle, Kohlenwasserstoffe, Schwefelkohlenstoff usw. als kolloide Teilchen in Wasser verteilt sind.

Versuche mit dem Tyndallkegel.

Dieser Nachweis erfolgte zunächst durch Versuche mit Hilfe des Tyndallkegels, welche ebenso wie die weiter unten beschriebenen ultramikroskopischen Versuche von dem einen von uns, P. Klein, ausgeführt wurden.

Die folgende makroskopische Methode erwies sich als zweckmäßig.

Das Licht einer Bogenlampe wurde durch 3 in Abständen von etwa 3 mm übereinander befindlichen kreisrunden Durchbohrungen einer schwarzen Pappe auf die in einer Flasche mit planparallelen Wänden befindliche Flüssigkeit geworfen. Die Durchbohrungen hatten die Durchmesser 3, $1^3/_4$ und $^3/_4$ mm, so daß 3 Tyndallkegel entstehen konnten. Die Beobachtung erfolgte zweckmäßig nicht in Richtung der Lichtstrahlen, sondern senkrecht dazu. Es zeigte sich nun, daß bei einer völlig optisch leeren Flüssigkeit überhaupt kein Kegel sichtbar war. Das destillierte Wasser, auch von uns benutztes elektrisches Leitfähigkeitswasser, zeigte meist eine ganz schwache Andeutung des Kegels mit größtem Durchmesser. Diejenigen Stoffe, welche nach der folgenden Tabelle einen schwachen, aber deutlich sichtbaren Kegel erzeugen, sind solche; bei denen die beiden Kegel mit breiterer Basis in scharfen Umrissen sichtbar waren, der Kegel mit schmalster Basis aber gar nicht oder nur in ganz undeutlichen Umrissen sichtbar war. Starke Kegel ergaben diejenigen Stoffe, welche sämtliche 3 Kegel in scharfen Umrissen bei seitlicher Ansicht zeigten. Es wurden nur reinste Kahlbaumsche Präparate verwandt. Die schwerlöslichen Salze wurden von uns, wie an anderer Stelle dargelegt werden soll, so gereinigt, daß Unreinheiten den Tyndalleffekt nicht beeinflußten. Damit die Wirkung von Unreinheiten nach Möglichkeit ausgeschaltet wurde, untersuchten wir einerseits nur sehr verdünnte Lösungen, andererseits wurden nur solche Flüssigkeiten in Wasser gelöst, welche als solche keinen Tyndallkegel ergaben.

[1]) Mittlerweile gelang es, stark milchige Emulsionen derartiger Stoffe herzustellen, welche einen stalagmometrischen Ausschlag ergaben. Vgl. darüber die demnächst erscheinende ausführliche Mitteilung in der Zeitschr. f. Kolloide.

Wir fügen in folgender Tabelle den Narkoticis eine Anzahl anderer Stoffe hinzu, um die von uns festgestellte, für die Kolloidlehre wie Biologie gleich beachtenswerte Gesetzmäßigkeit in weiterem Umrisse zu zeigen, wobei allerdings auf die an anderer Stelle erscheinende eingehendere Darstellung hingewiesen wird.

Tyndallkegel.

Starke Kegel	Konzentr. in Gew.%	Schwächere Kegel	Konzentr. in Gew.%	Keine Kegel	Konzentr. in Gew.%
Tetrachlorkohlenstoff	gesätt.	Pentan	gesätt.	i-Amylalkohol	0,1
Perchloräthan	„	Thymol	„	Paraldehyd	0,2
Amylen	„	m-Kresol	0,2	Propylacetat	0,1
Benzol	0,1	Benzoesäure	gesätt.	Pyridin	0,2
Amyläther	0,2	Capronsäure	0,1	Buttersäure	0,1
Heptylalkohol	0,05	Fumarsäure	gesätt.	Chloressigsäure	0,2
Benzylalkohol	0,2	Adipinsäure	0,7	Oxalsäure	—
Salicylsaures Methyl	gesätt.	Hydrozimtsäure	0,2		
Schwefelkohlenstoff	„	Calciumsulfat	gesätt.		
Anilin	0,3	Bleisulfat	„		
Chinolin	0,2	Silberchlorid	„		
Caprylsäure	0,05	Calciumoxalat	„		
Nonylsäure	0,025				
Undecylsäure	gesätt.				
Ölsäure	„				
Salicylsäure	„				
Silberbichromat	„				
Calciumphosph.	„				
Bariumcarbonat	„				

Es zeigte sich allgemein: daß sämtliche Stoffe, welche in Wasser schwer löslich sind, darunter auch die Narkotica, wie die Halogenalkyle, Kohlenwasserstoffe, Schwefelkohlenstoff usw., zum mindesten teilweise, soweit nicht ausschließlich in Form von Amikronen und Submikronen gelöst sind. Eine Lösung von Chlorkohlenstoff in Wasser ist eine mit bloßem Auge unsichtbare Emulsion lediglich von Submikronen und vielleicht nicht einmal Amikronen, denn wären Amikronen oder gar molekulardisperse Teilchen vorhanden, so würde die Lösung bei der stalagmometrischen Untersuchung sich als oberflächenaktiv erwiesen haben. Dieser Schluß wird

durch die weiter unten beschriebenen Versuche mit Nonylsäure sowie die Untersuchungen in bezug auf Gibbs' Prinzip nahegelegt.

Ultramikroskopische Untersuchungen.

Diese Versuche wurden mit einem guten Leitzschen Spiegelkondensor ausgeführt und bestätigten nicht nur unsere Schlüsse auf Grund der Tyndallkegelversuche, sondern erweiterten dieselben in erheblichem Maße, insofern als es bei diesen Versuchen auch möglich war, konzentrierte wässerige Lösungen von Narkoticis wie anderen Stoffen zu untersuchen. Die Versuche führten zu dem überraschenden Ergebnis, daß beispielsweise in gesättigter völlig klarer Lösung von i-Amylalkohol, Oktylalkohol, i-Buttersäure, Anilin, Toluidin, Xylidin, m-Kresol usw. Hunderte von Submikronen mit lebhafter Brownscher Bewegung sich dahinbewegten und nicht nur in gesättigter Lösung! Der Satz, wonach sämtliche in Wasser schwer löslichen Stoffe in kolloider Form zum mindesten teilweise gelöst sind, ist insofern zu erweitern, als auch Stoffe mit beschränkter Löslichkeit in Wasser wie Amylalkohol, Anilin, Isobuttersäure in konzentrierten Lösungen in Form von Submikronen und Amikronen gelöst sind.

Im einzelnen sei folgendes bemerkt: Eine gesättigte völlig klare Lösung von Chlorkohlenstoff zeigte noch nach 2 Tagen inmitten des Präparats in 100 Quadranten 100 äußerst kleine, schnell bewegliche Submikronen; etwa dieselbe Zahl wurde bei einer gleichaltrigen gesättigten Chloroformlösung gezählt. Bemerkenswert war es, mit welcher ganz außerordentlichen Schnelligkeit sich die Chloroformsubmikronen nach der Grenze des Deckglases zu fortbewegten (siehe w. u.).

Gesättigte Lösungen von Isoamylalkohol sowie Oktylalkohol zeigten etwa 300—500 zum Teil äußerst kleine, schnell bewegliche Submikronen! Eine $^3/_4$ gesättigte Isoamylalkohollösung enthielt noch 200 Submikronen, und in einer zur Hälfte gesättigten Isoamylalkohollösung waren noch 15—20 Submikronen in 100 Quadranten sichtbar, während die in der $^1/_4$ gesättigten Lösung noch sichtbaren 2—4 Submikronen auf Verunreinigungen zurückzuführen sein könnten.

Besonders bemerkenswert waren die Untersuchungen mit Stoffen der Benzolreihe, wie Benzol, Anilin, o-Toluidin, m-Xylidin, m-Kresol usw. In gesättigten Benzollösungen waren 200—300 kleine, schnell bewegliche Submikronen in 100 Quadranten sichtbar, und ebenso war das in Benzol gelöste Wasser kolloidal: Etwa 100 äußerst winzige Teilchen in 100 Quadranten bewegten sich mit großer Geschwindigkeit im Gesichtsfelde! Ein prächtiges Sternenmeer von 500—800 größeren und kleineren Teilchen wanderte unter lebhaftester Bewegung in gesättigten Lösungen von Anilin, o-Toluidin, m-Xylidin sowie m-Kresol im Gesichtsfelde einher, und ganz zweifellos dürfte die starke Adsorptionsfähigkeit gerade derartiger Stoffe der Benzolreihe an Kohle usw. mit dem hochkolloiden Zustande dieser Stoffe zusammenhängen, denn kolloide Teilchen eines Stoffes erhöhen die Adsorption infolge ihrer nachherigen Verteilung in kleinere Teilchen stärker als molekulardisperse Teilchen. Auch wässerige Lösungen von Stoffen wie Chinolin, Benzoesäure usw. erwiesen sich als kolloidal.

Ein besonders interessantes Kapitel bilden die Fettsäuren:

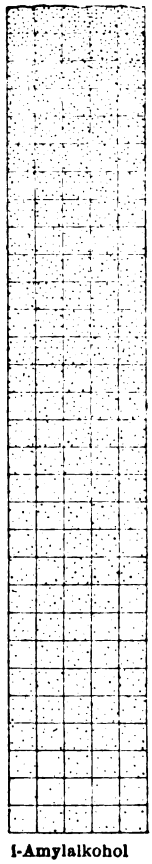
Während eine 2proz. wässerige Lösung von i-Buttersäure weder im Tyndallkegel noch Ultramikroskop kolloide Teilchen erkennen ließ, zeigte eine gesättigte Lösung der Säure eine Teilchenzahl von 10—15 Teilchen inmitten des Deckglases in 100 Quadranten (vgl. w. u.); bei Caprylsäure wurden 20 Teilchen, bei gesättigter Nonylsäurelösung 200 Teilchen beobachtet und bei einer geklärten Ölsäurelösung sogar 600—800 kleine, schnell bewegliche Teilchen. Es zeigte sich ferner in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Windisch und Dietrich (siehe l.c.), daß derartige Säuren wie Nonylsäure und Undecylsäure aus einer oberflächenaktiven und oberflächeninaktiven Form bestehen. Eine erhebliche Oberflächenaktivität wird nur durch die kleinen Teilchen herbeigeführt, d. s. die molekulardispersen Teilchen, vielleicht auch durch Amikronen; da wo eine nicht allzu große Zahl von Submikronen vorhanden ist, erscheinen die Lösungen oberflächeninaktiv. Kataphoretische Versuche führten zu dem Ergebnis, daß die kolloiden Teilchen zur Anode wanderten, aber in derselben Richtung wanderten auch kolloide Basen, wie Anilin, Toluidin und Xylidin! Ein fast paradox erscheinendes Ergebnis, vergleichbar mit der

bekannten Tatsache, daß kolloide Metalle und Metalloide wie Schwefel gleiche Ladung besitzen.

Nur einige besonders charakteristische Versuche mit Nonylsäurelösungen mögen hier mitgeteilt sein.

Eine 0,05 proz. nicht ganz gesättigte, völlig klare Nonylsäurelösung wurde bei 220 Volt und 0,1 Ampere 2 Stunden lang kataphorisiert. Die Kathodenflüssigkeit war völlig klar und zeigte einen kaum merklichen Geruch, die Anodenflüssigkeit war stark trübe und roch intensiv. In einem Stalagmometer, welches für Wasser die Tropfenzahl 45,4 ergab, zeigte die Kathodenflüssigkeit fast dieselbe Tropfenzahl 45,2, dagegen die Anodenflüssigkeit die Tropfenzahl 95,4, während die nichtkataphorisierte Flüssigkeit die Tropfenzahl 90,8 ergeben hatte. Ultramikroskopisch enthielten beide kataphorisierten Lösungen nur 4—8 große bewegliche Submikronen in 100 Quadranten, die nichtkataphorisierte Flüssigkeit dagegen etwa 200. Der anfängliche Gedanke, daß die Kathodenflüssigkeit keine Nonylsäure enthielt, war falsch. Denn beim Zusatz von 2—3 Tropfen 0,1 n-Salzsäure zu 10 ccm Flüssigkeit zeigte die Kathodenflüssigkeit die Tropfenzahl 91,5! Und mehrere 100 schnellbeweglicher, sehr kleiner Submikronen wurden sichtbar. Das, was bei indifferenten Narkoticis bisher nicht gelang, gelang hier: eine Zertrümmerung der oberflächeninaktiven größeren Submikronen in kleinere oberflächenaktive Submikronen, Amikronen und molekulardisperse Teilchen.

Abb. 1.



Eukupinotoxin

i-Amylalkohol

Diese Zertrümmerung größerer in kleinere Teilchen wurde in Zusammenhang mit obigem Versuche noch ersichtlicher durch eine zweite 2stündige Kataphorese einer dieses Mal völlig gesättigten, ein wenig trüben Nonylsäurelösung. Nach beendeter Kataphorese zeigte im Gegensatz zum ersten Versuche, obwohl auch hier eine Klärung der Kathoden- und Trübung der Anodenflüssigkeit stattgefunden hatte, die Kathodenflüssigkeit im Stalagmometer die Tropfenzahl 97,7, die Anodenflüssigkeit 94,2 und nicht die kataphorisierte Flüssigkeit 100,0 Tropfen; ultramikroskopisch waren in 100 Quadranten der Kathodenflüssigkeit 100—150 kleine, schnell bewegliche Teilchen und in der Anodenflüssigkeit 150—200 kleine, schnell

bewegliche Teilchen sichtbar. Nach Zusatz von einigen Tropfen 0,1 n-Salzsäure verschwanden diese Teilchen in der Kathodenflüssigkeit, die kleinen Submikronen wurden zu Amikronen und molekulardispersen Teilchen zertrümmert. Also bei dem ersteren Versuche bewirkte die Salzsäure eine Zertrümmerung großer Submikronen zu vorwiegend kleineren Submikronen, bei dem letzteren Versuche eine Zertrümmerung kleiner Submikronen zu Amikronen und molekulardispersen Teilchen.

Gibbs' Prinzip.

Gelegentlich seiner zahlreichen ultramikroskopischen Beobachtungen bemerkte der eine von uns, P. Klein, daß gewisse Stoffe, welche in wässeriger Lösung inmitten des Deckglases zunächst Hunderte von Teilchen gezeigt hatten, allmählich immer weniger Teilchen erkennen ließen, und man konnte deutlich feststellen, daß die Teilchen mit einer mehr oder weniger großen Geschwindigkeit an die Grenzfläche der wässerigen Lösung und des Cedernöls gewandert waren, um sich dort zu konzentrieren.

Die beistehenden Abbildungen ergeben ein sorgfältig hergestelltes Bild, in welcher Weise eine sehr stark oberflächenaktive Substanz wie Eukupinotoxin[1]) und eine etwas weniger stark oberflächenaktive Substanz wie i-Amylalkohol sich verteilt hatten. Die beiden Abbildungen sind auf Zentimeterpapier angefertigt, wobei 1 Quadrat 4 Quadraten der Mikrometerskala bei 800facher Vergrößerung entspricht.

Indem auf die ausführliche Arbeit hingewiesen wird, möge hier die folgende kleine Tabelle — nur auszugsweise wiedergegeben — genügen:

	Konzentration	Teilchenzahl in 100 Quadranten sogleich nach Darstellung des Präparates	Teilchenzahl in 100 Quadranten nach etwa 20 Min. in der Mitte	Teilchenzahl in 100 Quadranten nach etwa 20 Min. an d. Grenzfläche v. Öl und Wasser	Bewegungsgröße der Teilchen
i-Amylalkohol . . .	gesättigt	300—500	100	500—600	sehr klein, schnell bewegt
Oktylalkohol	„	300—500	300	1500—2000	winzig, schnell bewegt
Tetrachlorkohlenstoff	„	—	100	500	klein, schnell beweglich
Chloroform	„	100	0	2000 unbewegl. werdend	winzig, außerordentlich geschwind
Anilin	0,25 n	—	3—5	300—400	sehr klein, schnell bewegt
o-Toluidin	gesättigt	500—600	400—500	800—900	sehr klein, schnell bewegt
n-Xylidin	„	800—1000	800	mehr als 2000	klein, schnell beweglich
Chinolin	0,2 %	—	1—2	200	winzig, schnell bewegt
i-Buttersäure	gesättigt	—	10—15	300—500	klein, schnell beweglich
n-Kresol	„	500—600	400—500	1000—1500	sehr klein, schnell bewegl.

[1]) Vgl. Traube, diese Zeitschr. 98, 197. 1919.

Gibbs' Prinzip zeigt sich somit experimentell bestätigt, indem sich oberflächenaktive Stoffe an der Phasengrenzfläche von Öl und Wasser wie auch Luft und Wasser ansammeln, und das Konzentrationsgefälle der sichtbaren Teilchen erwies sich in der Tat um so größer, je oberflächenaktiver der betreffende Stoff ist (s. die Abbildung). Der Isoamylalkohol ist weit weniger oberflächenaktiv als das Eukupinotoxin.

Bei oberflächeninaktiven Stoffen wie Kongorot, Azoblau, Kieselsäure, Mangandioxyd, Silberbichromat erfolgt keine Anreicherung an der Oberfläche. Bei Gold und Aluminiumhydroxyd konnte sogar das umgekehrte Phänomen beobachtet werden: eine Flucht der Teilchen von der Grenzfläche Öl-Wasser nach der Mitte der Flüssigkeit hin.

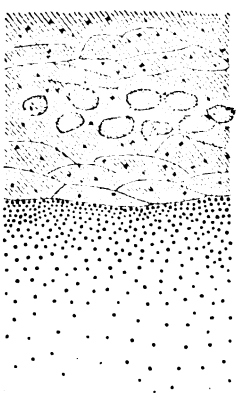


Abb. 2.

Eine Wanderung der Submikronen in das Cedernöl hinein wurde in keinem Falle festgestellt, wie das ja auch durchaus verständlich ist, dahingegen gibt die anbei befindliche Abbildung 2 einen Versuch wieder, bei welchem in die Mitte des Deckglases ein Tropfen gesättigter Xylidinlösung und ringsherum etwas Lecithin angebracht wurde. Ein Strom von Teilchen in Form einer Gibbsschen Schicht bewegte sich an der Lecithinoberfläche entlang, eine erhebliche Anzahl aber drang in das Lecithin ein, indem die Teilchen sich an demselben Orte hin und her bewegten und bei weiterem Eindringen in das Lecithin wurden die Teilchen allmählich immer unbeweglicher.

Nunmehr kann eine klare Antwort auf alle die Einwände gegeben werden, welche infolge der scheinbaren Oberflächeninaktivität von Chlorkohlenstoff, Chloroformlösungen usw. gegen die Traubesche Theorie der Narkose erhoben worden sind.

An der Grenzfläche von Luft-Wasser scheinen derartige Lösungen oberflächeninaktiv, weil nur größere Submikronen vorhanden sind und die Verteilung an der Oberfläche daher weitaus geringer ist, als

bei molekulardisperser Verteilung. Die Anreicherung der Teilchen nach Gibbs wurde in allen Fällen beobachtet.

Flockung von Eiweiß und anderen Kolloiden durch Narkotica.

Nach den bekannten Untersuchungen von Moore und Roaff[1]), Battelli und Stern[2]), sowie Warburg und Wiesel[3]) würde man anzunehmen haben, daß Kolloide wie insbesondere Eiweißstoffe sowie auch Lecithin durch oberflächenaktive Nichtleiter geflockt werden, andererseits folgt aus den Arbeiten von Duin und Kruyt, sowie namentlich von Freundlich und Rona[4]), daß durch oberflächenaktive Nichtleiter eine Sensibilisierung der Salzflockungen stattfindet. Freundlich und Rona sprachen die Vermutung aus, daß es sich bei der Flockung der Nucleoproteide durch oberflächenaktive Nichtleiter nach Battelli und Stern wohl nur um eine Sensibilisierung handle und uns selbst scheint es, daß diese Forscher zum Teil recht haben. Ebenso ist O. Meyerhoff[5]) der Meinung, daß auch bei den von Warburg und Wiesel untersuchten Eiweißflockungen nur eine solche Sensibilisierung in Betracht komme.

Die Frage, ob auch bei Ausschluß von Salzen durch Nichtleiter eine Kolloidflockung stattfinden kann, wird hiernach als nicht bewiesen angesehen und doch ergeben die folgenden an dieser Stelle nur ganz kurz erwähnten Ausführungen, daß ganz allgemein Kolloidsole von Emulsoiden und Suspensoiden ebenso wie Suspensionen durch oberflächenaktive Nichtleiter auch bei Abwesenheit von Salzionen geflockt werden, indessen nur dann, wenn die Nichtleiter in solcher Menge zugesetzt werden, daß die Sättigung der Lösung überschritten wird. Wenn man beispielsweise ein reines Arsensulfidsol oder Albuminsol mit soviel i-Amylalkohol versetzt, daß i-Amylalkoholtröpfchen sich ausscheiden, so erfolgt eine irreversible Flockung des Arsensulfid- bzw. Eiweißsols, indem die Arsensulfid- bzw. Eiweißflöckchen nicht etwa vom i-Amylalkohol

[1]) Moore und Roaff, Proc. Roy. Soc. **77**, 86. 1906.
[2]) Battelli und Stern, diese Zeitschr. **52**, 226. 1913.
[3]) Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. **144**, 465. 1912.
[4]) Freundlich und Rona, diese Zeitschr. **81**, 87. 1917.
[5]) Meyerhoff, diese Zeitschr. **86**, 325. 1918.

umhüllt werden, sondern die i-Amylalkoholtröpfchen adsorbieren an der Phasengrenzfläche zur wässerigen Lösung die Arsensulfid- bzw. Eiweißflocken. Der eine von uns, J. Traube, hatte diese Feststellungen zunächst bei Suspensionen von Kohle und Schwefel gemacht und der andere, P. Klein, zeigte alsdann, daß diese Flockung durch oberflächenaktive Nichtleiter auch bei gelösten Kolloiden statthat[1]). Im allgemeinen zeigt sich, daß die Flockungen bei um so geringeren Konzentrationen erfolgen, je oberflächenaktiver die betreffenden Nichtleiter sind. Nichtleiter, welche in jedem Verhältnis in Wasser löslich sind, wie etwa Propylalkohol, wirken nicht flockend; flockend wirken nur solche oberflächenaktive Nichtleiter, welche wie i-Amylalkohol usw. beschränkt löslich sind. Da nun in gesättigter und übersättigter Lösung die oberflächenaktiven Nichtleiter (siehe w. o.) in Form von Submikronen und Amikronen enthalten sind, so handelt es sich hier um eine Flockung durch kolloidale Nichtleiter und zwar u. a. auch durch indifferente Nichtleiter!

Denkt man nun an die Anreicherung dieser Nichtleiteramikronen und -submikronen an den Phasengrenzflächen der Zellen nach Gibbs Prinzip, so ist es unzweifelhaft, daß auch im Organismus die Narkotica derartige Flockungen herbeiführen. Und hierbei ist es besonders bedeutungsvoll, daß diese Flockungen irreversibel sind. Sind die Narkoticummengen nicht zu groß, so wird ja die Schädigung der Zellen durch derartige Flockungen einigermaßen ausgeschaltet werden können, bei größeren Mengen von Narkoticis wird aber die Schädigung eine dauernde und so dürfte auf derartige Flockungen in erster Linie die nachteilige und eventuell tödlich verlaufende Wirkung der Narkotica zurückzuführen sein. Die Sensibilisierung durch Salze ist nicht so zu erklären, wie dies von Freundlich und Rona geschieht, sondern dieselbe ist nach unserer Ansicht einfach darauf zurückzuführen, daß die Oberflächenaktivität der oberflächenaktiven Nichtleiter bei Gegenwart von Salzen zunimmt (der Haftdruck abnimmt) und dementsprechend wird auch die Adsorption vergrößert.

---

[1]) Hierbei muß der Nichtleiter z. B. in alkoholischer Lösung zugefügt werden, um eine zunächst kolloidale Verteilung desselben zu bewirken. Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß positiv geladene Salze wie Eisenhydroxyd und Aluminiumhydroxyd nicht geflockt wurden.

Am Schlusse dieser Arbeit möchten wir dem Herrn Stud. A. Szegvari für seine sehr wertvolle Unterstützung unseren Dank aussprechen.

Zusammenfassung.

1. Versuche mit Hilfe des Tyndallkegels und Ultramikroskops ergaben, daß sämtliche in Wasser schwer löslichen Stoffe wie Kohlenwasserstoffe, Halogenalkyle, höhere Homologe der Alkohole, Fettsäuren usw. anorganische und organische Salze, ferner auch Stoffe von größerer, aber beschränkter Löslichkeit wie Isoamylalkohol, Isobuttersäure, Anilin usw. in gesättigten und konzentrierten Lösungen zum mindesten teilweise kolloidal gelöst sind.

2. Dieser Satz gilt voraussichtlich auch allgemein für schwerlösliche Stoffe in anderen Lösungsmitteln als Wasser (beispielsweise Wasser in Benzol usw.).

3. Die scheinbar mangelnde Oberflächenaktivität der Narkotica, wie Kohlenwasserstoffe und Halogenalkyle usw. bei stalagmometrischen Untersuchungen ist auf den nicht genügend dispersen Zustand derselben zurückzuführen.

Versuche mit Basen wie Atropin usw. und schwerlöslichen Säuren wie Nonylsäure, Zimtsäure usw. ergaben, daß solche basische und saure Stoffe je nach ihrem Dispersitätsgrade in einer oberflächenaktiven und oberflächeninaktiven Form erhalten werden können.

Sind nur größere Submikronen vorhanden, so scheinen die Lösungen bei stalagmometrischer Untersuchung oberflächeninaktiv. Werden dieselben durch geeignete Zusätze (stärkeres Alkali bei den kolloiden Basen, stärkere Säuren bei den kolloiden Säuren) zu kleineren Amikronen und namentlich molekulardispersen Teilchen zertrümmert, so werden die Lösungen bei Untersuchung nach den Tropfmethoden oberflächenaktiv. Bei indifferenten kolloiden Stoffen (Narkotica usw.) ist diese Zertrümmerung der oberflächenaktiven Submikronen bisher nicht gelungen.

4. Daß diese nach den Tropfmethoden oberflächeninaktiv scheinenden Narkotica bei genügender Dispersitätserhöhung stark oberflächenaktiv sind, beweist die uns gelungene für verschiedenste Gebiete der Biologie bedeutungsvolle Sichtbarmachung von Gibbs' Prinzip. Je oberflächenaktiver ein Stoff ist, um so mehr reichert sich derselbe an den Phasengrenzflächen an. Stoffe, welche auch

im molekulardispersen Zustande oberflächeninaktiv sind (Salze, gewisse Farbstoffe usw.), reichern sich an der Oberfläche nicht an, sondern ergeben ein negatives, das umgekehrte Gibbssche Phänomen.

5. Schwerlösliche Stoffe der Benzolreihe sind besonders hochkolloidal. Hiermit hängt ihre starke Adsorptionsfähigkeit an Kohle usw. zusammen.

6. Kataphoretische Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß die kolloiden Teilchen von Säuren wie Nonylsäure, Caprylsäure usw. ebenso wie die kolloiden Teilchen von Basen wie Anilin, Toluidin, Xylidin nach demselben Pole zur Anode wandern, während eine Base wie Chinolin zur Kathode wandert. Für die molekulardispersen Teilchen war eine Wanderung nicht nachzuweisen.

7. Wässerige Lösungen kolloider Stoffe (lyophile wie lyophobe Lösungen, sowie auch Suspensionen werden irreversibel geflockt wenn oberflächenaktive Nichtleiter in solcher Menge zugesetzt werden, daß die Sättigung der Lösung erreicht wird. In Anbetracht der nach Gibbs Prinzip erfolgenden starken Anreicherung der Narkotica an Grenzflächen ist die Erscheinung geeignet, die durch größere Mengen dieser Stoffe verursachte schädliche bzw. tödliche Wirkung zu erklären.

Anmerkung von J. Traube: Nach Fertigstellung des vorliegenden Manuskripts sandte mir Herr H. Führer seine soeben in dieser Zeitschr. **115**, 235. 1921 veröffentlichte Arbeit über die narkotische Wirkung des Benzins und seiner Bestandteile (Pentan, Hexan, Heptan, Oktan). In experimenteller Hinsicht habe ich selbstverständlich gegen die schönen und wichtigen Versuche Führers nichts einzuwenden; aber ebenso darf ich wohl annehmen, daß Führer nach den Feststellungen der vorliegenden Arbeit die theoretischen Einwände, welche derselbe gegen meine Narkosetheorie erhoben hat, nun nicht mehr aufrechterhalten wird.

Zur Kenntnis der Neutralsalzwirkungen auf das Pflanzenplasma.

II. Mitteilung.

Von

Hugo Kahho (Dorpat, Estland).

(Eingegangen am 27. April 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Durch die grundlegenden Arbeiten von Hofmeister[1]), seiner Schüler [Levit[2]), Pauli[3])] und anderer Forscher [Höber[4])] wurde die Tatsache festgestellt, daß die Neutralsalze in bezug auf die Eiweißfällung keine sog. kolligativen Eigenschaften aufweisen, da die Salzlösungen mit der gleichen Anzahl von Partikelchen durchaus ungleich wirken. Es wurden die bekannten „Hofmeisterschen Reihenfolgen" der Ionen aufgestellt, die später von Freundlich[5]) als lyotrop bezeichnet wurden.

Da seitens vieler Biologen die Eiweißstoffe als die wichtigsten Verbindungen im Protoplasma angesehen werden, entstand bei mir die Frage, ob die koagulierende Wirkung der Neutralsalze auf Eiweißlösungen und Protoplasma parallel geht. Es muß dabei vorausgesetzt werden, daß diejenigen chemischen Verbindungen, welche tödlich auf das Plasma wirken, auch die Koagulation der Eiweißkörper desselben hervorrufen[6]).

Methodisches.

Um die koagulierende Wirkung der Neutralsalzlösungen auf das Pflanzenplasma zu prüfen, könnte man auf zweierlei Weise

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **24**, 247. 1888; **25**, 3. 1889; **27**, 395. 1890; **28**, 210. 1891.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **24**, 1. 1887.

[3]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 225. 1902.

[4]) Ebenda **11**, 35. 1908.

[5]) Capillarchemie 1909, S. 54, 410, 418ff.

[6]) Vgl. W. W. Lepeschkin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **30**, 533. 1912.

verfahren: Erstens, erfahrungsmäßig solche Konzentrationen der Salze bestimmen, welche in einem gewissen Zeitabschnitt eine ungefähr gleiche Menge der Zellen in den Schnitten abtöten, oder zweitens, die Salzlösungen gleicher Normalität innerhalb einer bestimmten Zeit wirken lassen und die physiologischen Effekte vergleichen.

Wegen einiger Vorteile wurde der letzte Weg gewählt.

Die Versuche wurden an den Schnitten von Rotkohl und Tradescantia zebrina ausgeführt.

Es wurden aus der Oberseite eines gut turgescenten Blattes von Rotkohl, aus den mittleren Teilen, Plättchen gewonnen, die vorsichtig von einer Seite bis zum anthocyanhaltigen Gewebe abgeschabt und in kleine viereckige (ca. 1 qmm) und ungefähr gleich dicke Schnitte zerlegt wurden. Vor dem Gebrauch wurden die Schnitte sorgfältig kontrolliert. Für die Beobachtungen waren die Epidermiszellen der Oberseite des Blattes bestimmt.

In jede zu untersuchende Lösung kamen 120—150 solcher Schnitte, von denen in gleichen Zeitabschnitten je 10 herausgenommen, auf 15 Minuten in destilliertes Wasser gebracht und nachher in Rohrzuckerlösung auf dem Objektglas plasmolysiert wurden, um die Menge der lebendigen bzw. koagulierten Zellen zu bestimmen.

Durch die Vorversuche war es möglich, die Zeitabschnitte so zu wählen, daß die Wirkung eines jeden Salzes im vollen Maße zur Geltung kam, mit dem Stadium, wo die Zellen noch vollständig intakt waren, beginnend, bis zum Tode des ganzen Schnittes. Um die koagulierende Wirkung der Salzlösungen besser abzustufen, wurden die in der Zuckerlösung plasmolysierten Schnitte nach der Größe der plasmolysierten Fläche in 5 Gruppen geteilt (s. Tabelle I) und das Prozent der plasmolysierten Gesamtfläche für je 10 Schnitte ausgerechnet. Es sei hier beispielsweise eine Tabelle angeführt.

Die in der Tabelle I angeführten Teile der plasmolysierten Schnittfläche bedeuten, daß, wenn z. B. $^3/_4$ einer Schnittfläche als plasmolysiert bezeichnet sind, das übrige Viertel aus toten Zellen besteht. Dasselbe bezieht sich auf die Zahlen (%) der letzten Spalte der Tabelle. Im Verlauf der Arbeit werden die Resultate mit den Rotkrautschnitten in Prozenten mitgeteilt (letzte Spalte der Tabelle).

Da die angewandten Salzlösungen ziemlich hohe Konzentrationen hatten, die mehr oder weniger starke Plasmolyse hervorriefen, fragte es sich, ob das Übertragen der Schnitte aus den Lösungen in destilliertes Wasser und das Wiederplasmolysieren in Zuckerlösung eine schädliche Wirkung auf die Plasmamembran ausüben konnte[1]).

Tabelle I. NaF 0,5n.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in Lösungen	Der plasmolysierte Teil der Schnittfläche					Plasmolysierte Gesamtfläche für je 10 Schitte %
	Die Zahl der Schnitte	4/4	3/4	2/4	1/4	0	
1 Stde.		10	—	—	—	—	100,0
2 Stdn.		9	1	—	—	—	97,5
3 „		9	1	—	—	—	97,5
4 „		4	5	—	1	—	80,0
5 „		2	5	2	1	—	75,0
6 „		—	7	3	—	—	67,5
8 „		1	6	1	2	—	65,5
9 „		—	4	4	2	—	55,0
10 „		—	—	3	5	2	27,5

Die Kontrollversuche, in denen genau dieselbe wiederholte Plasmolyse in isotonischen Rohrzuckerlösungen ausgeführt wurde, zeigten, daß solche Behandlung von Rotkrautzellen ohne sichtbaren Schaden ertragen wird. Es sei hier erwähnt, daß diese Pflanze ein außerordentlich unempfindliches Objekt darstellt.

Es konnte nicht auf das Deplasmolysieren der mit den Salzlösungen behandelten Schnitte verzichtet werden, da das Austreten von Anthocyan aus den Zellen kein zuverlässiges Merkmal für die Koagulation des Plasmas ist. Die abgetöteten Zellen können eine Zeitlang ihre Farbstoffe im Zellsaft behalten, wenn die Isotonie der Außenlösung dieselbe bleibt. Auf diese Tatsache hat neuerdings W. Brenner[2]) hingewiesen. Bringt man die koagulierte Zelle aus der Lösung ins Wasser, so bekommt der Plasmaschlauch einen Riß und der Inhalt der Vakuole tritt heraus.

Bei den Epidermisschnitten von Tradescantia zebrina, die aus der Unterseite des Blattes hergestellt waren, mußte wegen der größeren Empfindlichkeit des Objektes anders verfahren werden. Aus den Salzlösungen (gewöhnlich 0,2n) kamen die

[1]) Vgl. W. Lepeschkin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 28, 385. 1910.
[2]) Ebenda 38, 277. 1920.

Schnitte in eine hypertonische (0,5 Mol) Saccharoselösung, welche die vorhandene Plasmolyse vergrößerte. Auf diese Weise war es hier möglich, die koagulierten Zellen zu erkennen. Um eine bestimmte Vorstellung von dem Wirkungsgrad eines jeden Salzes zu bekommen, wurde hier die Gesamtmenge der Zellen in den Schnitten, die etwas größer waren als bei Rotkraut (ca. 2—2,5 qmm) mit einer Genauigkeit bis 10% festgesetzt, die Zahl der abgetöteten bzw. lebendigen Zellen genau ermittelt und das Prozent der letzteren ausgerechnet. Zum Vergleich wurden die Mittelwerte aus den Zahlen von je 10 Schnitten genommen. Es ist begreiflich, daß alle Zahlen, die in den Tabellen angezeigt sind, hier nur einen qualitativen Wert haben.

Um eine gleichmäßige Permeabilität für die Salze zu erzielen, wurden alle Versuche außer denjenigen, deren Resultate in der Tabelle II ersichtlich sind, im Dunkeln ausgeführt. Zu einer jeden Serie der Versuche, wo die Wirkung verschiedener Anionen mit demselben Kation (oder umgekehrt) untersucht wurde, waren die Rotkrautschnitte von demselben Blatte und von den nahegelegenen Stellen desselben hergestellt. Bei Tradescantia wurden, wegen der kleinen Blattfläche, die Schnitte von mehreren Blättern gewonnen und vor der Verteilung in Portionen gut durchgemischt.

Es wurden Äquivalent-Normallösungen chemisch reiner Salze angewandt. Krystallwasser der Salze wurde stets berücksichtigt.

Ergebnisse.

Die Tabelle II enthält die Resultate einer Serie von Versuchen mit den Rotkrautschnitten. Durch die angegebenen Zahlen ist die plasmolysierte Fläche für je 10 Schnitte bezeichnet (s. letzte Spalte der Tabelle I).

Vergleichen wir die Wirkung der in der Tabelle II angeführten 4 Gruppen der Salze, so sehen wir, daß die Giftigkeit derselben von der ersten Gruppe bis zur letzten rasch zunimmt. Während bei den Sulfaten, Citraten und Tartraten nach dem 10stündigen Aufenthalt der Schnitte in den Lösungen noch durchschnittlich weniger als die Hälfte der Zellen koaguliert war, d. h. mehr als die Hälfte (mit Ausnahme des NH_4-Citr.) eine Deplasmolyse und eine neue Plasmolyse in Zuckerlösung durchzumachen fähig waren, ist in den Lösungen von Chloriden und Acetaten schon

Tabelle II.

Rotkohl. Konzentr. der Lösungen 0,5 n. T. 25° C.

I.

Die Zeit des Aufenth. der Schnitte in Lös.	K_2SO_4 %	$(NH_4)_2SO_4$ %	Na_2SO_4 %	K-Citrat %	NH_4-Citrat %	Na-Citrat %	K-Tartr. %	NH_4-Tartr. %	Na-Tartr. %
1 Stde.	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5 Stdn.	92	67	65	87	10	82	65	65	75
10 „	77	67	62	45	0	57	55	32	60
Mittelwerte aus den Daten von je 10 Zeitabschnitten. Bei jedem Salz 100 Schnitte*)	82,2	75,0	74,0	76,5	32,0	78,0	58,5	60,5	78,6

II.

Die Zeit des Aufenth. der Schnitte in Lös.	KCl %	NH_4Cl %	NaCl %	$KC_2H_3O_2$ %	$NH_4C_2H_3O_2$ %	$NaC_2H_3O_2$ %
30 Min.	92	45	45	52	77	52
2 Stdn.	37	37	32	10	30	30
3 „	15	37	25	0	17	17
Mittelwerte aus den Daten von je 10 Zeitabschnitten. Bei jedem Salz 100 Schnitte*)	49,7	44,5	35,0	19,0	29,2	23,5

III.

Die Zeit des Aufenth. der Schnitte in Lös.	KNO_3 %	NH_4NO_3 %	$NaNO_3$ %	KBr %	NH_4Br %	NaBr %
30 Min.	52	37	65	20	30	50
60 „	37	22	36	7	15	37
110 „	27	2	37	0	0	17
Mittelwerte aus den Daten von je 11 Zeitabschnitten. Bei jedem Salz 110 Schnitte*)	35,2	22,2	46,6	17,0	27,0	37,7

IV.

Die Zeit des Aufenth. der Schnitte in Lös.	KJ %	NH_4J %	NaJ %	KCNS %	NH_4CNS %	NaCNS %
10 Min.	27	32	42	15	25	25
30 „	20	32	22	5	0	15
60 „	17	12	12	0	0	0
110 „	0	0	0	—	—	—
Mittelwerte aus den Daten von je 6 Zeitabschnitten. Bei jedem Salz 60 Schnitte*)	20,8	28,8	28,0	10,7	7,5	16,5

*) In diesen Mittelwerten sind die Ergebnisse aller von uns mit den Salzlösungen 0,5 n angestellten Versuche, auch der hier nicht angeführten, eingeschlossen.

nach 3 Stunden der größte Teil der Zellen tot, indem die maximale Zahl der plasmolysefähigen Zellen in erwähnten Lösungen beim Ammoniumchlorid etwa ein Drittel der Gesamtmenge beträgt.

Stärker als die Chloride und Acetate wirken die Nitrate und Bromide und am stärksten die Jodide und Rhodanide.

Der Zusammenhang zwischen der Wirkungszeit der Kaliumsalze (0,5 n) und der Koagulation von Rotkrautplasma ist durch die Kurven der Abb. 1 wiedergegeben.

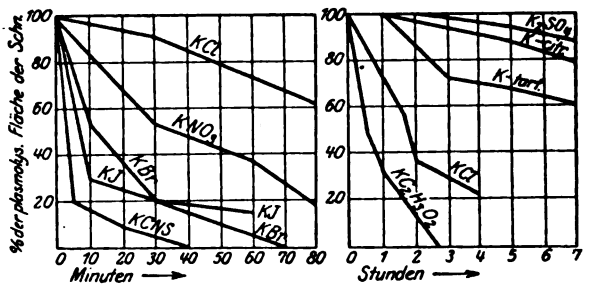


Abb. 1.

Die Versuche mit den Schnitten von Tradescantia ergaben dieselben Resultate.

In den folgenden Übersichtstabellen sind die Anionenwirkungen von Kalium-, Ammonium- und Natriumsalzen angeführt.

Tabelle III.

Tradescantia zebrina. Konzentr. der Lösungen 0,2 n. T. 21° C.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in Lösungen	KBr	KJ	KNO_3	KCNS	KCl	$KC_2H_3O_2$	K-Tartr.	K_2SO_4	K-Citr.
	Jede Zahl ist das Mittelprozent der plasmolysierten Zellen in 10 Schn.								
30 Min.	94,8	91,9	98,4	93,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 Std.	86,6	91,4	95,3	96,5	95,9	100,0	100,0	100,0	100,0
1 Std. 30 Min.	75,4	89,5	89,9	89,6	94,1	91,5	94,1	100,0	100,0
2 Std.	58,0	55,7	75,7	72,2	84,4	81,4	90,5	98,4	98,6
2 Std. 30 Min.	29,6	58,7	76,6	80,1	85,0	80,0	91,3	100,0	96,1
3 Std.	22,5	29,9	63,1	60,1	75,0	84,6	90,7	94,3	100,0
4 „	2,7	3,9	29,0	60,4	53,1	62,0	70,7	95,6	95,5
8 „	0	0	0	0	29,7	68,0	79,5	94,6	94,0
10 „	—	—	—	—	37,3	51,6	85,4	86,9	91,7
12 „	—	—	—	—	34,9	67,2	67,6	91,2	87,7
24 „	—	—	—	—	22,9	31,4	45,1	62,4	91,2
Das Mittel	33,6	38,2	48,0	50,2	64,7	74,3	83,2	93,0	95,8

Wie die Tabelle III zeigt, sind auch hier die Bromide, Rhodanide, Jodide und Nitrate die wirksamsten, indem in den Lösungen

dieser Salze schon nach 8 Stunden alle Zellen in den Schnitten absterben. Die Wirkungsunterschiede der 4 übrigen Salze der Tabelle sind bei Tradescantia viel kleiner als beim Rotkohl. Das Rhodanid, welches beim Rotkohl am stärksten wirkt, verhält sich hier etwas abweichend.

Tabelle IV.

Tradescantia. Konzentr. der Lösungen 0,2 n. T. 20—21° C.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in Lösungen	NH_4CNS	NH_4J	NH_4Br	NH_4NO_3	$(NH_4)_2HPO_4$	NH_4Cl	$(NH_4)_2SO$
	Jede Zahl ist das Mittelprozent der plasmolysierten Zellen in 10 Schn.						
30 Min.	96,4	98,4	100,0	96,1	100,0	100,0	100,0
1 Std.	43,4	100,0	96,2	96,8	98,1	97,5	100,0
1 Std. 30 Min.	35,8	100,0	90,7	98,5	100,0	100,0	97,1
2 Std.	24,2	78,7	82,1	87,1	100,0	97,0	100,0
2 Std. 30 Min.	12,4	79,7	93,5	92,4	90,3	100,0	100,0
3 Std.	25,9	88,3	85,0	88,0	79,7	100,0	100,0
4 „	8,8	84,9	85,0	88,6	87,4	93,0	100,0
6 „	9,6	18,3	29,6	74,3	90,7	97,2	100,0
8 „	0	16,4	36,4	77,5	76,6	79,7	100,0
10 „	—	12,0	10,1	86,6	70,9	95,1	96,3
12 „	—	0	0	81,8	84,2	94,7	95,8
24 „	—	—	—	16,8	14,4	46,1	26,1
Das Mittel	21,4	56,4	59,0	82,0	82,7	91,7	93,0

Die Ammoniumsalze wirken im allgemeinen etwa schwächer als die Salze des Kaliums (s. Tab. IV).

Die Stellung des Rhodanids stimmt auch hier mit der beim Rotkohl überein.

Tabelle V.

Tradescantia. Konzentr. der Lösungen 0,2 n. T. 20—21° C.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in Lösungen	NaCNS	NaJ	$NaNO_3$	NaBr	$NaC_3H_5O_3$	NaCl	Na-Tartr.	Na_2SO_4	Na-Citr.
	Jede Zahl ist das Mittelprozent der plasmolysierten Zellen in 10 Schnitten								
30 Min.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 Stde.	98,4	100,0	98,1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 Stdn.	92,7	88,2	98,5	100,0	97,5	100,0	100,0	100,0	100,0
3 „	89,2	96,6	87,7	100,0	98,8	98,4	100,0	100,0	100,0
4 „	75,4	81,6	89,4	95,9	97,9	92,5	100,0	100,0	100,0
6 „	40,8	81,8	92,0	92,2	91,3	98,2	100,0	100,0	100,0
8 „	14,8	55,9	87,6	84,7	86,3	98,6	100,0	100,0	100,0
10 „	25,0	68,4	84,5	88,1	94,5	92,8	92,5	100,0	100,0
12 „	7,5	14,2	8,3	41,6	61,7	81,2	100,0	100,0	100,0
24 „	0	18,3	46,6	22,8	64,3	55,1	71,9	93,5	100,0
Das Mittel	54,4	70,5	79,3	82,5	89,2	91,7	96,4	99,3	100,0

Aus der angeführten Tabelle V ist zu ersehen, daß bei den Natriumsalzen, welche nach der abnehmenden Giftigkeit geordnet

sind, etwa dieselbe Reihenfolge der Anionen von Geltung ist wie bei den Kalium- und Ammoniumsalzen. Doch ist die Koagulationsenergie der Natriumsalze viel geringer als die des Kaliums.

Tabelle VI.

Kationen der Alkali- und Erdalkalisalze.

Tradescantia. Konzentr. der Lösungen 0,2 n. T. 21° C.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in Lösungen	KCl	NH_4Cl	NaCl	$SrCl_2$	$MgCl_2$	$BaCl_2$	$CaCl_2$
	Jede Zahl ist das Mittelprozent der plasmolysierten Zellen in 10 Schn.						
4 Stdn.	53,1	93,0	92,5	100,0	100,0	100,0	100,0
8 „	29,7	79,7	98,6	100,0	100,0	100,0	100,0
10 „	37,3	95,1	92,8	96,0	100,0	100,0	100,0
12 „	34,9	94,7	81,2	96,9	100,0	100,0	100,0
16 „	—	—	—	79,9	88,9	85,7	97,0
20 „	—	—	—	91,2	82,1	89,9	100,0
24 „	22,9	46,1	55,1	—	—	—	—
Das Mittel	35,5	81,7	84,0	94,0	95,1	95,9	99,5

Die Daten der oben angeführten Tabelle VI zeigen, daß die koagulierende Wirkung der einwertigen Kationen bedeutend größer ist als die der zweiwertigen, die bei diesen Versuchsbedingungen verhältnismäßig unschädlich waren.

Besprechung der Resultate.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen folgt unmittelbar, daß die koagulierende Wirkung der Salze auf das Plasma von den beiden Ionen des Salzes abhängig ist, also einen additiven Charakter hat, wobei den Anionen eine größere Bedeutung zukommt als den Kationen.

In der folgenden Übersichtstabelle A sind die Anionenreihen aller Versuchsserien nach abnehmender Koagulationsenergie geordnet.

Alle Reihenfolgen sind die Modifikationen der bekannten lyotropen Reihe[1]). Man kann aus diesen Reihen eine Mittelreihe ableiten, die folgendermaßen aussieht:

$$CNS > J > Br > NO_3 > C_2H_3O_2 > Cl > \text{Tartrate} > \text{Citrate} > SO_4.$$

Diese Anionenreihe stimmt mit der lyotropen ziemlich gut überein.

[1]) Freundlich l. c.; Höber, Physikal. Chemie der Zelle usw. 1914, S. 308ff.

A. Übersichtstabelle der Anionenwirkungen.

Pflanze	Konz.	Kation	Anionen
Tradescantia	0,2 n	K	Br, J > NO_3, CNS > Cl > $C_2H_3O_2$ > Tartrat, SO_4, Citrat*).
		NH_4	CNS > J, Br > NO_3 > Cl, SO_4.
		Na	CNS > J > NO_3, Br > $C_2H_3O_2$, Cl, Tartrat, SO_4, Citrat.
Rotkohl	0,35 n**)	K	Br > J, CNS > $C_2H_3O_2$, NO_3, Cl, Tartrat, SO_4.
		NH_4	J > CNS > $C_2H_3O_2$, Br, NO_3, Cl > Tartrat, SO_4.
		Na	CNS, J > $C_2H_3O_2$, Cl, NO_3 > Tartrat, SO_4.
	0,5 n	K	CNS > J, Br > NO_3, $C_2H_3O_2$ > Cl > Tartrat > Citrat > SO_4.
		NH_4	CNS > J, NO_3, Br > $C_2H_3O_2$ > Cl > Citrat > Tartrat > SO_4.
		Na	CNS > J, Br, $C_2H_3O_2$, NO_3, Cl > SO_4, Citrat, Tartrat.
	0,75 n**)	K	CNS > J, Cl > Tartrat > Citrat, SO_4.
		NH_4	CNS > Br, Cl, NO_3 > SO_4.
		Na	CNS, J, Br > Cl > NO_3, $C_2H_3O_2$ > SO_4, Tartrat, Citrat.

*) Durch Kommas sind diejenigen Anionen abgetrennt, deren Wirkung einander nahe liegt.

**) Die Ergebnisse dieser 2 Versuchsserien sind der Raumersparnis wegen oben nicht angeführt. Sie stimmen mit den Resultaten der übrigen Serien vollständig überein.

Die Unterschiede in Kationenwirkungen der Alkalisalze sind nicht im allgemeinen so scharf abgestuft als die der Anionen.

Eine Gegenüberstellung aller Kationenreihen, nach abnehmender Giftigkeit geordnet, zeigt uns folgende Tabelle B.

B. Übersichtstabelle der Kationenwirkungen

Salz/Pflanze	Tradescantia (0,2 n)	Rotkohl (0,5 n)	Rotkohl (0,75 n)
	Kationen*)		
Rhodanid . .	NH_4 > K > Na	NH_4, K, Na	K, NH_4, Na
Jodid . . .	K > NH_4 > Na	K, NH_4, Na	
Bromid . . .	K > NH_4 > Na	K > NH_4, > Na	
Nitrat . . .	K > NH_4 > Na	NH_4 > K > Na	Na, NH_4
Acetat . . .	K > Na	K, Na, NH_4	
Chlorid . . .	K > NH_4 > Na	Na, NH_4, K	K, Na, NH_4
Tartrat . . .	K > Na	K, NH_4, Na	
Citrat . . .	NH_4 > K, Na	NH_4 > K, Na	
Sulfat . . .	K, NH_4 > Na	Na, NH_4 > K	Na, K, NH_4

*) Siehe die erste Bemerkung bei der vorigen Tabelle.

Wie man aus dieser Vergleichung sieht, sind die Kationenreihen bei den höheren Konzentrationen (0,5 n; 0,75 n) weniger regelmäßig als bei 0,2 n. Dieses erklärt sich dadurch, daß bei hohen Konzentrationen die Kationenwirkungen ziemlich gleich sind und die Unterschiede innerhalb der Grenze des Versuchsfehlers liegen. Darum ist es schwierig, für alle Fälle eine bestimmte Reihenfolge aufzustellen[1]). Wenn wir aber die Resultate mit den Tradescantiaschnitten im Auge behalten, denn hier sind die Aktivitätsunterschiede am deutlichsten ausgeprägt, so erhalten wir die Reihenfolge $K > NH_4 > Na$. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß die Kaliumsalze hier die größte Giftwirkung auf das Pflanzenplasma haben.

Beim Vergleichen der Koagulationsenergie der Alkali- und Erdalkalikationen zeigte sich, daß die letzteren in allen Konzentrationen schwächer wirkten als die ersteren. Dieser Wirkungsunterschied zwischen den ein- und zweiwertigen Kationen ist sehr konstant und muß hervorgehoben werden. Bei den Chloriden ordnen sich die Kationen in folgender Weise, mit dem wirksamsten Ion am Anfange der Reihe (vgl. Tabelle VI) $K > NH_4 > Na > Sr$, Mg, Ba, Ca.

Die Tatsache, daß sich überall bei den Versuchen lyotrope Einflüsse geltend machen, spricht dafür, daß wir es hier mit einer Gesetzmäßigkeit der Salzwirkungen zu tun haben. Es fragt sich nun, ob die Giftwirkung der Salze direkt auf die Koagulation der Eiweißkörper des Plasmas zurückzuführen ist, oder ob hier noch andere Einflüsse in Betracht kommen. Ein Vergleich mit den Eiweißfällungsreihen zeigt, daß unsere Anionenreihe die umgekehrte des nativen und Alkalieiweißes ist[2]). Es sei hier darauf hingewiesen, daß Rhodanide, Jodide und Bromide, die dem Plasma gegenüber die giftigsten sind, bei dem negativen Eiweiß das schwächste Fällungsvermögen aufweisen[3]).

Dieselben umgekehrten Verhältnisse treten uns auch bei den Kationenwirkungen entgegen. Erdalkalien, die in bezug auf das Plasma relativ unschädlich sind, erzeugen irreversible Fällungen beim nativen Eiweiß[4]), während die Wirkung der

[1]) Vgl. Freundlich l. c. S. 429.

[2]) Pauli l. c.; Freundlich l. c. S. 426.

[3]) Höber l. c. S. 321 ff.

[4]) Pauli, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 27. 1903.

Alkalisalze reversibel ist. Beim Alkalieiweiß ist die Koagulationsenergie der Erdalkalien auch bedeutend größer als die der Alkalisalze. Die Wirkung beider Salzgruppen wird durch die Kationenreihe — $K < Na < Li < NH_4 < Mg < Ca < Sr < Ba$ charakterisiert, die etwa die umgekehrte Plasmakoagulationsreihe ist[1]).

Zur Erklärung einer solchen Umkehrung der Ionenreihen bei der Plasmakoagulation[2]) sehen wir 2 Möglichkeiten.

Die eine zeigt sich bei der Annahme, daß im Plasma der höheren Pflanzen positive Kolloide bzw. Eiweißkörper, den Ausschlag geben. In solchem Falle stimmten unsere Ionenreihen mit denen des Säureeinweißes ziemlich gut überein[3]).

Eine solche Annahme führte uns aber zu einer zweiten Voraussetzung, nämlich, daß die Plasmamembran für die geprüften Salze vollständig gleich permeabel sei.

Wenn auch in einigen Ausnahmefällen das Vorkommen positiver Kolloide im Plasma nicht völlig ausgeschlossen ist, obwohl in den meisten Fällen die Reaktion des Protoplasmas alkalisch ist, so widerspricht die Annahme der gleichen Durchdringlichkeit für Salze den Tatsachen vollständig. Pantanelli[4]) Lundegårdh[5]), in der letzten Zeit Fitting[6]) und Tröndle[7]) haben bei verschiedenen Pflanzen eine ziemlich ungleiche Permeabilität für die Alkali- und Erdalkalisalze gefunden. Damit fällt die erste Erklärungsmöglichkeit weg.

Eine weitere, wahrscheinlichere Erklärung besteht in der Auffassung der Plasmakoagulation durch die Salze als einem sekundären Vorgang, der mit den Permeabilitätsverhältnissen im engsten Zusammenhang steht. Für diese Annahme spricht die Tatsache, daß für die Permeabilität etwa dieselben lyotropen Ionenreihen gefunden sind wie hier bei der Plasmakoagulation. Bei der Untersuchung der Beeinflussung der Hitzekoagulation von Tradescantiaplasma durch Neutralsalze gelangten wir zu demselben Schlusse, nämlich, daß die Plasmakoagulation bei der hohen Temperatur durch die Salze etwa nach derselben lyotropen

[1]) Pauli und Handowsky, diese Zeitschr. **24**, 241. 1910.
[2]) Vgl. Höber l. c. S. 510.
[3]) Pauli, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **5**, 27. 1903.
[4]) Jahrb. f. wissensch. Botanik **40**, 303. 1904.
[5]) Kungl. Sv. Vet. Akad. Handl. **47**, Nr. 3, S. 129. 1911.
[6]) Jahrb. f. wissensch. Botanik **56**, 1. 1915.
[7]) Arch. de sc. phys. et nat. **45**, 117. 1918.

Reihe, wie gegebenenfalls, gefördert wird, und daß diese Förderung durch die Permeabilitätsverhältnisse der Salze bedingt ist[1]).

Es besteht also ein ausgesprochener Parallelismus zwischen der Permeabilität und der Giftwirkung.

In der Tat ist es bekannt, daß einige salzartige Verbindungen, die leicht vom Plasma aufgenommen werden, auch sehr schädlich sind. Dieses hat zuletzt noch G. Klebs bei den Farbstoffen hervorgehoben[2]).

Er bezeichnet die sauren Farbstoffe, die durch die Farnprothallien nicht gespeichert werden, als in hohem Grade unschädlich für sie. Nach ihm bleiben die Prothallien in den Lösungen (0,001 proz.; 0,01 proz.) 3 bis 4 Wochen, „bisweilen mehrere Monate in der überwiegenden Zahl ihrer Zellen frisch, grün und lebendig". Dagegen wirken die sämtlichen vitalfärbenden, basischen Farbstoffe sehr giftig. In 0,001% von Auramin, Jodgrün, Gentianaviolett u. a. stirbt schon der größte Teil der Prothallien in 1—2 Tagen ab.

Aus dem oben Gesagten geht unmittelbar hervor, daß, wenn wir die Durchlässigkeit der Plasmamembran für eine Salzlösung durch eine Veränderung der äußeren Bedingungen steigern könnten, damit auch die Giftwirkung der Lösung zunehmen müßte.

Das ist tatsächlich der Fall und läßt sich experimentell nachweisen. Am leichtesten ist eine solche Permeabilitätsvergrößerung zu erzielen durch die von Lepeschkin[3]) und Tröndle[4]) gefundene und neuerdings durch Blackman und Paine[5]) bestätigte Tatsache, daß die Plasmadurchlässigkeit im Lichte größer ist als im Dunkeln.

Es wurden parallel Versuche in einem sonnigen Raum (vor der direkten Insolation waren die Schnitte durch ein mattes Glas geschützt) und im Dunkeln angestellt. Die Temperatur in beiden Fällen war annähernd gleich (23—24° C). Für eine größere Zuverlässigkeit wurden je 2 Versuchsserien angestellt.

Aus den Daten der Tabelle VII geht hervor, daß die koagulierende Wirkung eines gut permeierenden Salzes (NaJ ist ein

[1]) Diese Zeitschr. **117**, 87. 1921.

[2]) Sitzungsber. d. Heidelb. Akad. d. Wiss., Math.-nat. Kl., Abt. B, S. 3, 1919, veröffentl. von L. Jost.

[3]) Beih. z. botan. Zentralbl. **24**, 334. 1909.

[4]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **27**, 71. 1909; Jahrb. f. wissensch. Botanik **48**, 171. 1910.

[5]) Ann. of Bot. **32**, 81. 1918.

Tabelle VII.

Rotkohl. Giftwirkung NaJ 0,48 n im Hellen und Dunkeln.

Die Zeit des Aufenthalts der Schnitte in Lösungen	Hell			Dunkel		
	I. Vers.	II. Vers.	Das Mittel	I. Vers.	II. Vers.	Das Mittel
	Jede Zahl ist das Proz. der plasmolys. Gesamtfläche bei je 10 Schn.					
10 Min.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
30 „	77,5	85,0	81,2	100,0	97,5	98,7
60 „	87,5	77,5	82,5	82,5	67,5	75,0
80 „	55,0	45,0	50,0	85,0	77,5	81,2
100 „	35,0	47,5	41,2	72,5	75,0	73,7
120 „	22,5	17,5	20,0	80,0	70,0	75,0
140 „	20,0	17,5	18,7	75,0	60,0	67,5
160 „	20,0	17,5	18,7	52,5	50,0	51,2
180 „	2,5	7,5	5,0	55,0	60,0	57,5
200 „	0	2,5	1,2	55,0	62,5	58,7
Das Mittel	44,7	40,7	42,7	75,7	72,0	73,8

solches!) im Lichte durchschnittlich 1,5—1,7 mal größer ist als im Dunkeln. Während bei der Belichtung nach 200 Minuten alle Zellen in den Schnitten abstarben, ist nach dieser Zeit im Dunkeln etwa die Hälfte aller Zellen noch lebend.

Ähnliche Resultate erhielten wir auch mit den anderen Salzen (NaBr, NaCNS).

Die Giftigkeitssteigerung der Salzlösungen im Lichte steht zweifellos im engsten Zusammenhang mit den Permeabilitätsverhältnissen. Dafür spricht die Tatsache, daß beim Tradescantiaplasma eine ungefähr gleiche Vergrößerung der Durchlässigkeit (1,3—18 mal) für KNO_3, dunkel—hell, gefunden worden ist[1]).

Also je mehr ein Neutralsalz in das Plasma eindringt, desto giftiger ist seine Wirkung, und relativ unschädliche Salze haben eine unbedeutende Eindringlichkeit.

Eine nähere Untersuchung der Permeabilitätsverhältnisse, worüber in der nächsten Mitteilung berichtet werden soll, bestätigt auch das Obengesagte.

Sollte hier das Umgekehrte der Fall sein, würde nämlich die Permeabilität durch die Giftwirkung der Salze bedingt sein, so müßten von den Neutralsalzen die Erdalkalien die größte Giftigkeit (bzw. Permeabilität) haben, weil sie sowohl beim negativen Eiweiß als auch bei den Lipoiden[2]) die größte Fällungskraft

[1]) Lepeschkin l. c.

[2]) Porges und Neubauer, diese Zeitschr. 7, 152. 1907.

aufweisen. Nun ist aber das nicht der Fall. Tröndle hat gezeigt, daß die Erdalkalien bedeutend schwächer eindringen als die Alkalisalze[1]). Für das Calciumchlorid konnte er, im Vergleich mit den anderen Erdalkalien, fast keine Permeabilität nachweisen. Es ist bekannt, daß dieses Salz in vielen Fällen für das unschädlichste gilt[2]).

Würden die Salze ihre Wirkung primär auf die Eiweißkörper des Plasmas haben, so müßte bei der schwach sauren Reaktion wenn nicht eine völlige Umkehrung der Ionenreihen[3]), doch jedenfalls eine Unregelmäßigkeit derselben erfolgen.

Alle angestellten Versuche bei einer sauren Reaktion der Lösung ($^n/_{6000}$—$^n/_{1000}$-HCl, COOH-COOH) ergaben etwa dieselben Resultate wie bei der neutralen. Die lyotropen Reihenfolgen der Ionen waren bei diesen Bedingungen sogar noch regelmäßiger und der einzige Einfluß der Säure bestand, im allgemeinen, in der etwaigen Förderung der Giftwirkung der Salze, wobei die Aktivitätsunterschiede der Ionen schärfer hervortraten.

Das Gesagte bezieht sich auch auf die alkalische Reaktion der Salzlösungen ($^n/_{3000}$—$^n/_{1000}$-KOH, NaOH, $^n/_{40}$-Na_2CO_3). Auch hier blieben die lyotropen Reihenfolgen unverändert. Doch im Gegenteil zu den H-Ionen, die die Giftigkeit der Salze in gewissen Konzentrationen vergrößern, üben die OH-Ionen einen schützenden Einfluß aus, indem sie die Resistenz des Plasmas gegen die schädliche Wirkung der Salze erhöhen[4]).

Es findet also bei den Plasmakolloiden keine Umladung statt. Diese Tatsache weist daraufhin, daß der Eintritt der Neutralsalze in das Plasma in erster Linie von solchen Verbindungen abhängig ist, die ein geringes Säurebindungsvermögen haben. Dieses kommt eher den Lipoiden, als den Eiweißkörpern zu[5]). Jedenfalls müssen wir die Neutralsalzpermeabilität des Plasmas als einen ganz unabhängigen Vorgang von der Giftwirkung derselben ansehen. Die Giftigkeit der Salze ist also eine Funktion der Permeabilität, nicht umgekehrt!

---

[1]) Arch. de sc. phys. et nat. **45**, 119, 121. 1918.

[2]) Vgl. Hansteen-Cranner, Jahrb. f. wissensch. Botanik **47**, 289. 1910; Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **37**, 380. 1919.

[3]) Vgl. J. Endler, diese Zeitschr. **45**, 359. 1912.

[4]) Vgl. Lepeschkin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **28**, 98. 1910.

[5]) Vgl. M. Hind, Ann. of Bot. **30**, 237. 1916.

Eine solche Auffassung der Permeabilitätsvorgänge führt uns zur Plasmaoberfläche. Denn gelangt schon ein Salz in größeren Mengen ins Plasma hinein, so wirkt es auch mehr oder weniger dehydratisierend auf die Biokolloide — in erster Linie werden wohl die Eiweißkörper ausgeflockt — was die Hauptursache des Todes in diesem Falle ist.

Die Salzionen müssen also von einer solchen Oberflächenschicht zurückgehalten werden, in welcher die von ihnen erzeugten reversiblen Veränderungen für das Leben des Plasmas nicht gefährlich sind und vom letzteren müßte eine solche Schicht immer wieder erneut werden können.

Sollte es die vielerwähnte Lipoidschicht sein oder eine labile Verbindung der Eiweißkörper mit den ersteren, jedenfalls ist es möglich, daß einige Neutralsalze in hohen Konzentrationen diese Schutzschicht so verdichten, daß sie nicht ins Plasmainnere gelangen können. Neuerdings hat Hansteen-Cranner[1]) gefunden, daß Calciumchlorid 0,01 n in plasmatischen Grenzschichten Lipoidfällungen hervorruft, während KCl in dieser Konzentration sich mehr oder weniger indifferent verhält. Es sei auch hier der früheren Versuche von E. Küster[2]) gedacht, nach welchen durch Calciumnitrat- und Rohrzuckerlösung in den Plasmaoberflächenschichten eine Verdichtung erzeugt wird.

Diese Befunde sind von großer Bedeutung, da gerade die Erdalkalien und besonders die Calciumsalze am weitesten die Fähigkeit besitzen auch bei den anderen Salzen die Giftwirkung zu vermindern bzw. völlig aufzuheben. Unseren Versuchen zufolge wird die Permeabilität bei den Wurzelzellen der gelben Lupine für KCl, KBr und KJ (0,2 n) durch ein vorläufiges Verweilen in einer Rohrzuckerlösung (0,33 Mol) stark herabgesetzt.

Es ist eine interessante Tatsache, daß zwischen der Lipoidfällungskraft und Giftwirkung der Neutralsalze ein umgekehrtes Verhältnis besteht. Außer den Erdalkalien, die für Lecithin gute Fällungsmittel sind und schon in schwachen Konzentrationen ($^n/_{100}$) die Wirkung haben, nimmt bei den Alkalisalzen die Koagulationsenergie nach der lyotropen Reihe $SO_4 > \cdots$ CNS ab[3])

[1]) l. c. S. 385. 1919.

[2]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 27, 589. 1909.

[3]) Porges und Neubauer l. c.

Es kann ja durchaus nicht ausgeschlossen sein, daß die Permeabilität für Neutralsalze einerseits auch auf mechanischem Wege reguliert wird, nämlich durch die Lipoidfällung auf der Plasmaoberfläche. Besonders kommt das den konzentrierten Lösungen zu.

Rhodanide und Jodide, die in keinen Konzentrationen Lecithin fällen, sind nicht imstande eine Schutzschicht beim Plasma zu erzeugen. Dagegen werden Lipoide durch das andere Endglied der lyotropen Reihe, durch Sulfate leicht ausgeflockt und es kann in starken Lösungen zur Bildung eines festen Oberflächenhäutchens kommen, was auch, wahrscheinlich, mit der relativen Unschädlichkeit dieser Salze bei unseren Versuchen in Zusammenhang steht.

Einen indirekten Beweis für die Annahme, daß hier die Lipoidfällung eine wichtige Rolle spielt, sehen wir im Verhalten der Pflanzenorgane in verdünnten Salzlösungen.

Nach den Versuchen von Lundegårdh[1]) wachsen die Wurzeln von Vicia faba in $^n/_{100}$-KCl- und NaCl-Lösungen schlecht, in Natriumsulfatlösung sterben sie nach 24 Stunden ab; in Natriumjodidlösung ist das Wachstum sistiert. Hier haben also die Endglieder der lyotropen Reihe die größte Giftigkeit. Bei dieser Konzentration kann die Lipoidfällung keinen überwiegenden Einfluß ausüben, und Sulfate, die am besten negatives Eiweiß fällen, wirken hier am stärksten. Denn beim längeren Verweilen der Wurzeln in Lösungen dringen auch die Sulfate, wenn auch sehr langsam, ins Plasma ein.

Es leuchtet ein, daß das Lipoidfällungsvermögen für die Neutralsalzpermeabilität nicht allein maßgebend ist, es sei hier ferner darauf hingewiesen, daß die Oberflächenspannung des Wassers durch die lyotrope Reihe $CNS < \cdots SO_4$ erhöht wird[2]). Auf das Plasma übertragen, würde das im allgemeinen einer schwachen Adsorption für die Neutralsalze entsprechen, der geringsten für die Sulfate und der verhältnismäßig bedeutendsten für die Rhodanide.

Die Giftwirkung der Neutralsalze besteht also aus dem Zusammenwirken folgender Faktoren: Aus dem Lipoidfällungsvermögen und der Adsorbierbarkeit, welche beide die Permeabilität des Plasmas in einer Richtung fördern, nämlich nach der

[1]) l. c. S. 162ff.

[2]) Freundlich, l. c., S. 60, 61; Höber, l. c., S. 310.

Reihenfolge CNS > · · · SO_4, ferner das Eiweißfällungsvermögen der Salze, welches gerade nach der umgekehrten Reihenfolge abnimmt.

Bei den verhältnismäßig kurzdauernden Versuchen mit konzentrierteren Salzlösungen wird die Durchlässigkeit für die Sulfate besonders stark herabgesetzt infolge der starken Lipoidfällung auf der Plasmaoberfläche und schwachen Adsorption, und infolgedessen tritt das Eiweißfällungsvermögen zurück. Die Aufnahme der Rhodanide steigt aber parallel zur Konzentration und von der relativ großen Menge des durchgedrungenen Salzes wird eine starke Dehydration der Biokolloide hervorgerufen.

In diesem Falle also geht die Giftwirkung der lyotropen Reihe CNS > · · · SO_4 nach.

Bei den längeren Versuchen mit schwachen Lösungen vermindert sich der Einfluß des ungleichen Lipoidfällungsvermögens und der Adsorbierbarkeit der Salze, die Differenzen gleichen sich bis zu einem gewissen Grade aus und hier haben auch die Sulfate, die sich allmählich mit der Zeit im Plasma anhäufen, eine starke Giftigkeit, gemäß der großen Eiweißfällungskraft. Die relativ unschädlichsten sind in diesem Falle die mittleren Glieder der lyotropen Reihe.

Dasselbe gilt auch für die Erdalkalien, nur mit dem Unterschied, daß das Lipoidfällungsvermögen hier auch in sehr schwachen Konzentrationen dominiert. Dieses, zusammen mit der geringen Adsorbierbarkeit, kann die Ursache der relativen Unschädlichkeit dieser Salze sein.

Die Folge davon wäre, daß hier die Giftwirkung der lyotropen Reihe nach auch in schwachen Lösungen statthaben würde. Es wäre interessant, das experimentell nachzuweisen.

Von den anderen Erdalkalien unterscheidet sich das Mg durch schwächere Lipoidfällungskraft, was auch der größeren Eindringlichkeit (bzw. Giftigkeit)[1]) dieses Salzes nicht widerspricht. Alles Gesagte anläßlich der Sulfate bezieht sich auch auf das Magnesium. Es sei hier noch darauf hingewiesen, daß sich beim Alkalieiweiß Mg seiner Wirkung nach an die übrigen Erdalkalien anschließt[2]).

[1]) Vgl. Hansteen-Cranner, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **37**, 380. 1919.

[2]) Pauli und Handowsky l. c.

Berichtigung.

Infolge eines Versehens bei der Korrektur ist in meiner I. Mitteilung (diese Zeitschr. **117**, 87) die Erklärung zum Schema der Versuchsanordnung fortgeblieben. Das sei hier nachgeholt.

In Abb. I bedeutet:

I. Messingwanne.
II. Glaswände.
III. Gläserne Objektwanne.
IV. Thermometer.
V. Rührer.
VI. Horizontalmikroskop.

Die Wirkungsstärke der Narkotica.

I. Versuche am isolierten Froschherzen.

Von

H. Fühner.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Königsberg i. Pr.)

(Eingegangen am 1. Mai 1921.)

Die Wirkungsstärke aller pharmakologisch wichtigen indifferenten Narkotica ist bisher vergleichend nur an Kaulquappen festgestellt worden in den bekannten Versuchen von H. Meyer[1]) und seinen Schülern und von Overton[2]). Die Vergleichung der Wirkungsstärke der Narkotica an diesem Objekt mit den Teilungskoeffizienten der Substanzen zwischen Öl und Wasser führte zur Aufstellung der Meyer-Overtonschen Lipoidtheorie der Narkose, die in erster Linie eine Theorie der narkotischen Wirkungsstärke ist.

Diese Lipoidtheorie wird namentlich von J. Traube bekämpft, der zugleich versuchte, sie durch eine andere physikalisch-chemische Theorie zu ersetzen.

Nach Traube[3]) sind die Narkotica Stoffe von geringem Haftdruck in Wasser und vermindern dementsprechend die Oberflächenspannung desselben. Sofern nicht besondere Giftwirkungen störend eingreifen, soll die Oberflächenspannung wässeriger Lösungen der Narkotica ihrer narkotischen Wirkung parallel gehen[4]), und Traube[5]) vermutet, daß die von ihm gefundenen Zahlen für die Oberflächenspannung sogar ein besseres Maß der reinen narkotischen Wirkung bilden als die von Overton an

[1]) H. Meyer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **42**, 109. 1899. — Derselbe und F. Baum, ebenda S. 119.

[2]) E. Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901.

[3]) J. Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. **153**, 304. 1913.

[4]) J. Traube, Ebenda **140**, 127. 1911.

[5]) J. Traube, Ebenda **105**, 558. 1904.

Kaulquappen bestimmten Werte. Betrachtet man die Zusammenstellung der Narkotica in Traubes Vergleichstabellen[1]), aus denen er seine Ansichten und Sätze ableitet, so fällt das Fehlen der flüchtigen Kohlenwasserstoffe und vor allem der Chlor- und Bromverbindungen auf, welchen praktisch als Narkoticis eine viel größere Bedeutung zukommt als den von Traube zumeist aufgeführten Substanzen homologer Reihen. Indessen hat Traube[2]) sich auch mit diesen Narkoticis beschäftigt, aber gefunden, daß für sie, als flüchtige Produkte mit sehr geringem Haftdruck, die Erniedrigung der Oberflächenspannung des Wassers „kein genaues Maß" des Haftdruckes und demnach der narkotischen Wirkung bildet, während letztere sonst im allgemeinen um so größer ist, je geringer der Haftdruck. Für das Chloroform namentlich gibt Traube an, daß Messungen der Oberflächenspannung seiner wässerigen Lösung nach der Tropf- und Steighöhenmethode „zu größten Fehlern" führen, un der sucht die auffallend geringe Capillaraktivität dieses und der genannten Substanzen durch ihre Flüchtigkeit und ihren hohen Dampfdruck zu erklären.

Meine Versuche an den normalen Grenzkohlenwasserstoffen in einer vor kurzem erschienenen Arbeit[3]) hatten mir gezeigt, daß es stark narkotisch wirksame Substanzen gibt, die nicht oder nur sehr wenig capillaraktiv sind. Nachdem ich dasselbe beim Chloroform und seinen wässerigen Lösungen wiederfand, habe ich mich eingehender mit diesem Verhalten beschäftigt. Hierbei kamen mir Zweifel an der Richtigkeit der Traubeschen Anschauungen, die mich veranlaßten, sie an einer größeren Anzahl halogenhaltiger und halogenfreier Produkte zu prüfen durch vergleichende Bestimmung ihrer narkotischen Wirkung und ihrer Oberflächenaktivität. Als Narkoseobjekt wählte ich das isolierte Froschherz, das sich nach meinen[4]) früheren Erfahrungen ausgezeichnet zu genauen quantitativen Bestimmungen reversibler Giftwirkungen eignet und an dem die

[1]) J. Traube, l. c. 1904, S. 555 und 1913, S. 285 u. a.

[2]) J. Traube, l. c. 1913, S. 304 u. 308. — Derselbe, diese Zeitschr. **54**, 316 u. 320. 1913. — Derselbe, Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. **1**, 282. 1914.

[3]) H. Fühner, diese Zeitschr. **115**, 235. 1921.

[4]) H. Fühner, Nachweis und Bestimmung von Giften auf biologischem Wege. Berlin, Wien 1911, S. 137. — Derselbe. Diese Zeitschr. **77**, 408. 1916.

Wirkungsstärke der wichtigsten Narkotica bisher vergleichend nicht festgestellt ist. Es wurden an ihm über 40 Substanzen geprüft. Die Bestimmung der Capillaraktivität derselben geschah in dem bequemen und heute vielgebrauchten Stalagmometer von Traube.

Das Froschherz wurde nach Straub (gerade enge Herzkanüle durch die linke Aorta in den Ventrikel) isoliert und arbeitete mit etwa $^1/_2$ ccm Ringerlösung in gläserner, sauerstoffdurchströmter feuchter Kammer. Die Bestimmung der Wirkungsstärke der Narkotica in wässeriger Lösung wurde nach meiner[1]) beim Muscarin und Acetylcholin angegebenen Auswaschmethode vorgenommen, die ich neuerdings, zusammen mit Herrn Dr. Kuhn[2]), auch für die quantitative Bestimmung des Chloroforms verwertet habe und die sich in gleicher Weise für andere Narkotica eignet. Je nach der Konzentration der Giftlösung und der schwächeren oder stärkeren herzschädigenden Wirkung derselben konnten bei Zimmertemperatur mehr oder weniger zahlreiche Vergiftungen an demselben Herzen großer Wasserfrösche unter graphischer Registrierung vorgenommen werden.

Da die Froschherzen sich, wie in meinen früheren Bestimmungen der Cholinester, auch gegenüber den Narkoticis als verschieden empfindlich erwiesen, mußten sie zu Beginn der Prüfungen erst geeicht werden. Dies geschah mit einer 7 proz. Alkohollösung (7 Vol.-Proz. Äthylalkohol Kahlbaum 99,8%), welche an empfindlichen Herzen schon bei erstmaliger Einwirkung rasch vollständigen Stillstand von Ventrikel und Vorhof herbeiführt, meist aber erst nach wiederholter Vergiftung. Durch gründliches längeres Auswaschen mit Ringerlösung läßt sich die Herznarkose vollkommen beseitigen. Zwischen die Alkoholvergiftungen wurden solche mit den zu prüfenden anderen Narkoticis eingeschaltet. Bei sehr empfindlichen Herzen, bei denen durch den 7 proz. Alkohol sofort Stillstand erfolgte, erwies es sich als zweckmäßig, schwächere Alkohollösungen, z. B. solche von 3,5% mit der zu prüfenden Substanzlösung zu vergleichen.

Zu den Versuchen fanden Narkoseäther Schering, Aceton und Äthylurethan Merck neben Urethan Höchst und Kahlbaum,

[1]) H. Führer, ebenda.

[2]) C. Kuhn, Die quantitative Bestimmung des Chloroforms auf pharmakologischem Wege. Diss. Königsberg 1921.

dann Veronal und Isopral Bayer und Chloräthyl Henning Verwendung. Alle übrigen Präparate stammten von Kahlbaum, Berlin. Die am Froschherzen zu prüfenden Lösungen wurden jeweils kurz vor den Versuchen hergestellt. Die käuflichen Präparate wurden nicht weiter gereinigt, abgesehen von den Essigestern, die vor dem Gebrauche durch Schütteln mit trockenem Natriumcarbonat entsäuert wurden.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in verschiedenen Tabellen zusammengestellt, von denen zunächst die erste besprochen sei.

In Tabelle I sind 41 Narkotica aufgeführt, die in wässeriger Lösung unter den angegebenen Bedingungen Herznarkose bewirken. Nicht aufgenommen sind die folgenden geprüften Substanzen: Pentan, Hexan, Heptan, Octan, Pentachloräthan, Hexachloräthan, Amylnitrit. Ihre gesättigten Lösungen brachten keinen Herzstillstand hervor.

Die Mehrzahl der geprüften Produkte ist bei Zimmertemperatur flüssig. Diese wurden, mit Ausnahme des Äthylchlorids, zu den Versuchen abgemessen und in Ringerlösung gelöst. Die übrigen wurden in gewogenen Mengen verwandt. Die dem Äthylalkohol von 7 Vol.-Proz. als gleichwirksam befundenen Verdünnungen sind in Spalte 2 der Tabelle in Volumprozenten aufgeführt. Durch Multiplikation mit dem spez. Gewicht (vgl. Tabelle III) wurden die Werte der Spalte 3 in Gewichtsprozenten erhalten. Division durch $^1/_{10}$ des Molekulargewichts (Spalte 1) ergab hieraus die Werte in Molen pro Liter (Spalte 4). Spalte 5 enthält die in einem Stalagmometer, das für Wasser bei Zimmertemperatur 39 Tropfen liefert, gefundenen Tropfenzahlen.

Die Tabelle bringt zuerst die Werte für die geprüften Alkohole. Für die normalprimären Alkohole steigt das Wirkungsverhältnis der molaren isonarkotischen Mengen nach den hier vorliegenden Bestimmungen am isolierten Froschherzen sowohl bei Berechnung aus dem Verhältnis Äthyl- zu Propylalkohol oder Propyl- zu Butylalkohol, wie aus dem von Äthyl- zu Heptylalkohol (hier durch Extraktion der 5. Wurzel) nicht genau um den Quotienten 3, entsprechend dem Traubeschen Capillargesetz, an, sondern um 3,37. Solche höheren Werte fand ich[1]) früher bei vergleichender Bestimmung der narkotischen Wirkungsstärke an zahlreichen Wassertieren. Es ist bemerkenswert, daß sich ein

[1]) H. Führer, Zeitschr. f. Biol. **57**, 487. 1912.

Tabelle I.

Narkotische Konzentration für das Froschherz.

Substanz	1 Molekul-Gewicht	2 Vol.-Prozent	3 Gew.-Prozent	4 Molen pro Liter	5 Tropfenzahl (Wasser = 39)
Methylalkohol . .	32	15,00	11,970	3,740	50½
Äthylalkohol. . .	**46**	**7,00**	**5,551**	**1,206**	**51¼**
Propylalkohol. . .	60	2,75	2,216	0,369	51½
Isopropylalkohol .	60	5,00	3,935	0,655	54
Butylalkohol, norm.	74	1,00	0,810	0,109	51¼
Isobutylalkohol . .	74	1,25	1,000	0,135	53½
Butylalkohol, tert.	74	6,00	4,716	0,637	62¾
Isoamylalkohol . .	88	0,40	0,324	0,039	52¼
Amylalkohol, tert.	88	2,00	1,620	0,184	57½
Heptylalkohol,norm.	116	0,04	0,033	0,003	51¼
Paraldehyd. . . .	132	2,00	1,980	0,150	49
Aceton.	58	8,00	6,392	1,102	51½
Äther	74	3,00	2,160	0,292	52½
Essigs. Methyl . .	74	2,00	1,902	0,257	46
„ Äthyl . . .	88	1,25	1,150	0,130	48½
„ Propyl . .	102	0,40	0,360	0,035	48
„ Isopropyl .	102	0,70	0,637	0,062	51¼
„ Isobutyl . .	116	0,20	0,178	0,015	48½
Urethan (Äthyl-) .	89	—	2,000	0,224	43¾
„ (Propyl-).	103	—	0,700	0,068	44¾
Veronal	184	—	0,500	0,027	42
Benzol	78	0,10	0,088	0,011	39
Isopral.	163	—	0,150	0,009	41
Chloreton	177	—	0,100	0,005	41¾
Chloralhydrat. . .	165	—	0,500	0,030	39¼
Methylenchlorid. .	85	0,10	0,137	0,016	39
Chloroform . . .	119	0,06	0,090	0,007	39
Tetrachlormethan .	154	0,03	0,048	0,003	39
Methylenbromid .	174	0,10	0,250	0,014	39
Bromoform. . . .	253	0,01	0,027	0,001	39
Methyljodid . . .	142	0,40	0,914	0,064	39
Äthylchlorid . . .	64	—	0,300	0,046	39
Äthylenchlorid . .	99	0,25	0,312	0,031	39
Äthylidenchlorid .	99	0,09	0,106	0,010	39
Tetrachloräthan. .	168	0,02	0,031	0,002	39
Äthylbromid . . .	108	0,25	0,362	0,033	39
Äthyljodid	156	0,10	0,194	0,012	39
Propylchlorid . .	78	0,15	0,133	0,017	39
Propylbromid. . .	123	0,07	0,101	0,008	39
Isopropylbromid .	123	0,10	0,131	0,010	39
Propyljodid . . .	170	0,05	0,087	0,005	39

solcher auch am isolierten Herzen des Frosches ergibt. Bei der Bestimmung der narkotischen Wirkung der Alkohole am ganzen Frosch fand ich damals den Quotienten 3,99, ein Ergebnis, das für eine höhere Empfindlichkeit des Zentralnervensystems gegenüber den höheren Alkoholen spricht, als sie der Herzmuskel aufweist. Eigentümlich erscheint in meinen Versuchen, daß die

geprüften normalen Alkohole in isonarkotischer Konzentration für das isolierte Herz auch genau isocapillar sind: Äthyl-, n-Propyl-, n-Butyl- und n-Heptylalkohol ergaben dieselbe Tropfenzahl von $51^1/_4$—$51^1/_2$. Hiernach nimmt die Capillaraktivität wässeriger Alkohollösungen auch nicht genau im Verhältnis 1 : 3 : 3^2 . . . zu, sondern der Quotient ist auch hier etwas höher als 3.

Während demnach die normalen primären Glieder der homologen Alkoholreihe in isonarkotischen Verdünnungen genau isocapillar sind, ist dies durchaus nicht der Fall bei den sekundären und tertiären Produkten: Zeigen die sekundären Isoalkohole (Isopropyl-, Isobutyl-, Isoamylalkohol) noch verhältnismäßig geringe Unterschiede gegenüber den normalprimären Produkten, so werden diese dagegen sehr beträchtlich bei den tertiären Alkoholen, von denen tertiärer Butyl- und Amylalkohol (Amylenhydrat) geprüft wurden. Zur Herznarkose genügen vom n-Butylalkohol 1 Vol.-Proz., vom Isoalkohol 1,25. Vom tertiären Produkt dagegen haben erst 6 Vol.-Proz. gleichstarke Wirkung. Der n-Butylalkohol von 1 Vol.-Proz. ergibt im Stalagmometer $51^1/_4$ Tropfen, der 6proz. tertiäre Alkohol $62^3/_4$ Tropfen. Isocapillar mit dem normalen Alkohol von 1 Vol.-Proz. ist eine etwa 2proz. Lösung des tertiären Produktes. Wie ich[1]) schon früher an anderer Stelle ausgeführt habe, ist demnach für die Alkohole mit verzweigter Kohlenstoffkette die capillare Wirksamkeit durchaus kein proportionales Maß ihrer pharmakologischen Wirkung. Der tertiäre Butylalkohol ist am Herzen 3mal weniger wirksam, als nach seiner Capillaraktivität zu erwarten wäre. Daß diese Wirkungsverminderung für die genannten Alkohole nicht nur für das Froschherz, sondern nach meinen[2]) älteren Bestimmungen auch für die Narkose von Fischen (Ellritzen) und nach Overtons Prüfungen für Kaulquappen gilt, zeigt die nachstehende kleine Tabelle II.

In Tabelle I folgt auf die Alkohole Paraldehyd und Aceton. Während der Paraldehyd narkotisch etwas wirksamer ist, als seiner Oberflächenaktivität entspricht, eine Erscheinung, die vielleicht auf geringe Verunreinigung durch Oxydationsprodukte zurückzuführen ist, stimmt das Aceton in isonarkotischer Verdünnung genau mit dem Äthylalkohol an Tropfenzahl überein.

[1]) H. Fühner und E. Neubauer, Zentralbl. f. Physiol. **20**, 117. 1906.
[2]) H. Fühner, Zeitschr. f. Biol. **57**, 469. 1912.

Tabelle II.

Narkotische Konzentration.

	Ellritzen Gew.-Prozent	Kaulquappen Gew.-Prozent	Froschherz Gew.-Prozent
n-Propylalkohol	0,40	0,66	2,22
Isopropylalkohol	0,90	0,77	3,93
n-Butylalkohol	0,13	0,28	0,81
Isobutylalkohol.	0,18	0,33	1,00
Tertiärbutylalkohol	—	1,00	4,72
n-Amylalkohol	0,04	—	—
Isoamylalkohol	0,05	0,20	0,32
Tertiäramylalkohol	—	0,50	1,62

Besonders wichtig ist dann die Wirkungsstärke des Äthers, verglichen mit seinem capillaren Verhalten. Isonarkotische Lösungen von Äther und Alkohol zeigen nahezu dieselbe Tropfenzahl. Die zur Herznarkose nötige, etwas höhere Konzentration des Äthers, als der Tropfenzahl des 7 proz. Alkohols entspricht, erklärt sich durch Verdampfung aus der Lösung während des Versuches. Daß der Äther aber trotz seiner großen Flüchtigkeit fast dieselbe Tropfenzahl wie der Alkohol ergibt, zeigt die Unrichtigkeit der Anschauung Traubes, daß Flüchtigkeit und hoher Dampfdruck die fehlende Oberflächenaktivität mancher Substanzen, wie z. B. des Chloroforms, erklären. Flüchtigkeit und Dampfdruck sind beim Äther bedeutend größer als beim Chloroform; trotzdem stimmt er — im Gegensatz zum Chloroform — in isonarkotischer Konzentration capillar mit dem Alkohol überein.

In der Tabelle folgen auf den Äther einige Essigester. Wie aus dem capillaren Verhalten hervorgeht, besitzen sie eine etwas höhere Giftigkeit als die bisher genannten Substanzen. Man wird geneigt sein, dies aus ihrer leichten Verseifbarkeit in wässeriger Lösung zu erklären. Für die beiden geprüften Ester der Carbaminsäure, das Äthyl- und Propylurethan, kommt eine solche Erklärung jedenfalls nicht in Betracht, da beide in wässeriger Lösung beständig sind. Auch eine besondere spezifische Giftigkeit für das Herz, wie sie von halogenhaltigen Narkoticis angenommen wird, kommt den Urethanen nicht zu: das Äthylurethan schädigt bei wiederholter Vergiftung das Herz nicht mehr als der Äthylalkohol unter denselben Bedingungen. Ich habe Äthylurethan drei verschiedener Fabriken vergleichend geprüft, um festzustellen, ob etwaige Verunreinigung die höhere

Wirksamkeit bedingt, als dem capillaren Verhalten entspricht: Alle drei Proben erwiesen sich als genau gleich wirksam. Mit der wirksamen Konzentration von Äthylurethan stimmt die entsprechende Verdünnung von Propylurethan gut überein: beide Urethane sind nicht capillarinaktiv, aber sie beeinflussen die Oberflächenspannung des Wassers nicht entsprechend ihrer narkotischen Wirkungsstärke. Eine Äthylurethanlösung von 2 Gew.-Proz. wirkt am Froschherzen so stark wie der 7 proz. Äthylalkohol. Dieselbe Tropfenzahl wie diese Alkohollösung ergibt aber erst die Lösung von 7 proz. Urethan. Letzteres ist also am Froschherzen mehr wie 3 mal wirksamer, als seiner Oberflächenspannung entspricht.

Die Urethane zeigen als erstes wichtiges Beispiel unter den geprüften Narkoticis, daß es auch nach Versuchen am isolierten Froschherzen Substanzen gibt von starker narkotischer Wirksamkeit, die schwach capillaraktiv sind. Diese Tatsache tritt uns noch deutlicher beim Veronal, am meisten ausgeprägt unter den geprüften halogenfreien Produkten beim Benzol entgegen.

Läßt sich die starke Herzwirkung des Veronals noch etwa aus der sauren Reaktion seiner Lösungen verständlich machen, so fehlt jegliche derartige Erklärungsmöglichkeit für das Benzol.

Das Benzol löst sich wenig in Wasser, doch immerhin reichlich genug, um in nicht einmal gesättigter Lösung Stillstand des Froschherzens herbeizuführen, der sich leicht durch Auswaschen beseitigen läßt. In dieser wirksamen Konzentration sind seine Lösungen vollkommen capillarinaktiv und ergeben, im Stalagmometer gemessen, genau die Tropfenzahl des Wassers. Aber auch die gesättigte Lösung, die nach unseren Bestimmungen etwa 0,017 Molen pro Liter enthält, zeigt im Stalagmometer die Tropfenzahl des Wassers (= 39), während der in Wasser weniger lösliche Heptylalkohol bei einer Konzentration von 0,004 Molen pro Liter die Tropfenzahl von 57 im gleichen Instrument ergibt. Auch die geringe Wasserlöslichkeit des Benzols kann demnach nicht entscheidend sein für seine fehlende Capillarwirkung, ebensowenig seine Flüchtigkeit oder sein Dampfdruck. Bei einem Siedepunkt von 80° besitzt das Benzol einen Sättigungsdruck von 75 mm Hg; der Äthylalkohol mit dem Siedepunkt 78° einen solchen von 44 mm. Wie wenig der Dampfdruck maßgebend ist für das capillare Verhalten, zeigt am besten neben dem erwähnten Beispiel des Äthers das des Acetons: bei einem Siedepunkt von 56° gegenüber dem

Äthylalkohol mit 78° besitzt das Aceton einen 4fach höheren Sättigungsdruck (= 180 mm) als der Alkohol, der sogar den des Chloroforms (= 160 mm) übertrifft. Trotzdem erwiesen sich von Alkohol und Aceton isonarkotische Lösungen auch als isocapillar.

Das Benzol schließt sich demnach in seinem narkotischen und capillaren Verhalten an die früher[1]) geprüften aliphatischen Kohlenwasserstoffe, Pentan, Hexan, Heptan und Octan an, deren Wasserlöslichkeit zwar nicht ausreichend ist zur Herznarkose, die aber als Inhalationsnarkotica am Warmblüter wirksam sind.

In der Tabelle I folgen auf das Benzol die halogenhaltigen Narkotica. Vorangestellt sind 3 Substanzen, die in narkotischer Konzentration wenigstens noch in geringem Maße capillaraktiv sind, während alle übrigen (16) Substanzen in dieser Konzentration die Tropfenzahl des Wassers aufweisen.

Von den ersten 3 Substanzen ist Isopral und Chloreton für das Verständnis des capillaren Verhaltens der ganzen Gruppe besonders wichtig. Isopral ist Trichlorisopropylalkohol, Chloreton (Acetonchloroform) ein Trichlortertiärbutylalkohol. Vergleicht man den Trichlorisopropylalkohol mit dem Isopropylalkohol in seiner narkotischen Wirkungsstärke, so findet man, daß die Substitution von 3 H-Atomen durch 3 Cl-Atome den Wirkungsgrad etwa 70fach gesteigert hat (0,655 : 0,009). Demgegenüber vermehrt die Chlorierung die capillare Wirksamkeit in viel geringerem Maße: eine gewisse Steigerung läßt sich zwar nachweisen, insofern die molare Menge von 0,009, welche beim Isopral immerhin eine schwache Oberflächenaktivität zeigt, beim chlorfreien Produkt ohne Wirkung ist. Isocapillar (= 54 Tropfen) mit der narkotischen Isopropylalkoholverdünnung von 0,655 Molen pro Liter ist aber erst eine Isoprallösung von 1,5 Gew.-Proz. (=0,09 Molen pro Liter), also genau die zehnfache Konzentration der narkotisch wirksamen Menge. Ein entsprechendes Verhalten mit noch größeren narkotischen Wirkungsunterschieden zeigt der tertiäre Butylalkohol und das Chloreton.

Capillar weniger wirksam als die gechlorten Alkohole ist der gechlorte Aldehyd, das Chloralhydrat, in der als isonarkotisch angenommenen Verdünnung von 0,5 Gew.-Proz., welche in Wirklichkeit mit dem 7proz. Alkohol nicht genau vergleichbar ist

[1]) H. Führer, diese Zeitschr. **115**, 235. 1921.

wegen der langsamen Einwirkung der Substanz, die sich am Froschherzen wie an anderen biologischen Objekten geltend macht. Die angegebene Konzentration von 0,5% ist zu hoch bemessen und wäscht sich darum am Froschherzen sehr schlecht aus. Sie gibt im Stalagmometer gegenüber dem Wasser eine Vermehrung der Tropfenzahl um etwa $^1/_4$ Tropfen. Um z. B. die Tropfenzahl zu erreichen, welche die wirksame Chloretonverdünnung von 0,1% ergibt, d. h. $41^3/_4$ Tropfen, ist schon eine 2,5 proz. Chloralhydratlösung nötig, also die 5fache der angenommenen narkotischen Konzentration.

Von diesen 3 Beispielen halogenhaltiger capillaraktiver Substanzen zeigen namentlich überzeugend die beiden Alkohole in Vergleichung mit den chlorfreien Ausgangssubstanzen, daß Halogenierung zwar sowohl narkotische Wirkung wie Oberflächenaktivität steigert, aber nicht in entsprechendem Maße: die narkotische Wirkung nimmt durch die Chlorsubstitution außerordentlich viel mehr zu als die Capillaraktivität. Damit erklärt sich, daß die gechlorten Alkohole, als Abkömmlinge der stark capillaraktiven Alkohole, in isonarkotischer Verdünnung eine schwache Capillaraktivität gerade noch erkennen lassen, während Chloroform und die anderen geprüften Produkte, deren Muttersubstanzen die capillar kaum wirksamen Kohlenwasserstoffe sind, in narkotischen Verdünnungen, ja z. T. auch noch in ihren gesättigten wässerigen Lösungen, capillarinaktiv sind.

Wie Tabelle III zeigt, gilt dies für die Mehrzahl der geprüften halogenhaltigen Substanzen, wobei bemerkt sei, daß die Konzentration der gesättigten Lösung z. T. ein Vielfaches der narkotischen Konzentration darstellt. Beim Chloroform ist die gesättigte Lösung etwa 9mal stärker als die narkotische. Man kann eine derartige Lösung wiederholt durch das Stalagmometer tropfen lassen, bis schließlich soviel Chloroform verdampft ist, daß sie keinen Stillstand mehr am Froschherzen hervorruft. Das Chloroform löst sich in Wasser zu 0,5 Vol.-Proz. oder 0,06 Molen pro Liter. Dieser Konzentration ist eine Ätherlösung von etwa 0,6 Vol.-Proz. äquimolekular. Während diese Chloroformlösung nur die Tropfenzahl des Wassers (= 39) im Stalagmometer gibt, erhält man von einer 0,5 proz. Ätherlösung 43 Tropfen und noch von einer 0,2 proz. Lösung 41 Tropfen. Dabei besitzt der Äther bei einem Siedepunkt

Tabelle III.

Wasserlöslichkeit.

	Spez. Gew.	Löslichkeit in Vol.-Proz.	Löslichkeit in Gew.-Proz.	Molen pro Liter	Tropfenzahl	Löslichk. n. Rex[1]) u. a. in Gew.-Proz.
Methylalkohol . . .	0,80	mischbar	mischbar	—	—	—
Äthylalkohol . . .	0,79	„	„	—	—	—
Propylalkohol. . . .	0,80	„	„	—	—	—
Isopropylalkohol . .	0,78	„	„	—	—	—
Butylalkohol, norm.	0,81	8,40	6,80	0,919	99	—
Isobutylalkohol . . .	0,80	12,50	10,00	1,351	—	—
Butylalkohol, tert. .	0,78	mischbar	mischbar	—	—	—
Isoamylalkohol . . .	0,81	2,50	2,02	0,230	82	2,6
Amylalkohol, tert. .	0,81	15,43	12,50	1,420	—	—
Heptylalkohol, norm.	0,82	0,12	0,10	0,008	57	—
Paraldehyd	0,99	12,12	12,00	0,909	—	—
Aceton	0,80	mischbar	mischbar	—	—	—
Äther	0,72	9,00	6,48	0,875	—	6,48
Essigs. Äthyl . . .	0,92	7,00	6,44	0,731	$75^1/_2$	—
„ Propyl . . .	0,90	2,30	2,07	0,203	$69^1/_2$	—
„ Isopropyl . .	0,91	3,00	2,73	0,267	72	—
„ Isobutyl. . .	0,89	0,60	0,53	0,046	$63^1/_2$	—
Urethan (Äthyl-) . .	—	—	100,00	11,236	—	—
Veronal	—	—	0,50	0,027	42	—
Benzol	0,88	0,16	0,14	0,018	39	0,072
Isopral	—	—	> 1,70	>0,104	—	—
Chloreton	—	—	0,50	0,028	50	—
Chloralhydrat. . . .	—	—	66,66	4,040	—	—
Methylenchlorid . .	1,37	1,30	1,78	0,209	$40^3/_4$	2,0
Chloroform	1,50	0,50	0,75	0,063	39	0,82—0,62
Tetrachlormethan . .	1,60	0,04	0,06	0,004	39	0,08
Methylenbromid . .	2,50	0,46	1,15[1])	0,065	39	1,15
Bromoform	2,77	0,05	0,14	0,005	39	—
Methyljodid	2,28	0,62	1,43	0,100	39	1,41
Äthylchlorid	—	—	0,57[1])	0,088	39	0,57
Äthylenchlorid . . .	1,25	0,60	0,75	0,075	41	0,87
Äthylidenchlorid . .	1,18	0,50	0,59	0,006	39	0,55
Tetrachloräthan . .	1,58	0,12	0,19	0,011	41	0,20
Äthylbromid	1,45	0,70	1,01	0,093	39	0,91
Äthyljodid	1,94	0,20	0,39	0,025	39	0,40
Propylchlorid . . .	0,89	0,45	0,40	0,051	39	0,27
Propylbromid . . .	1,35	0,20	0,27	0,022	39	0,24
Isopropylbromid . .	1,31	0,25	0,33	0,026	39	0,32
Propyljodid	1,74	0,05	0,09	0,005	39	0,10

von 35° den hohen Sättigungsdruck von 433 mm Hg, während das Chloroform mit dem Siedepunkt von 61° nur einen solchen von 160 mm aufweist. Flüchtigkeit und hoher Dampfdruck können demnach die fehlende Oberflächenaktivität des Chloroforms nicht erklären.

[1]) Vgl. A. Rex, Zeitschr. f. physikal. Chemie **55**, 355. 1906; V. Rothmund, Löslichkeit und Löslichkeitsbeeinflussung. Berlin 1907. S. 75; E. Frey, diese Zeitschr. **40**, 34. 1912; W. Plötz, ebenda **103**, 265. 1920.

Die halogenhaltigen Narkotica gelten als besonders starke Herzgifte. Man könnte denken, daß nur bei der Herznarkose, nicht bei der Narkose des Zentralnervensystems, solch bedeutende Unterschiede zwischen halogenhaltigen und halogenfreien Substanzen bestehen, wie sie in meinen Versuchen gefunden wurden. Doch berechnet sich bemerkenswerterweise aus Overtons Narkoseversuchen an Kaulquappen das gleiche Wirkungsverhältnis zwischen den beiden Reihen von Substanzen wie aus meinen Herzversuchen. Dies soll zunächst eine Vergleichung der Wirkungsstärke von Chloroform, Äther und Äthylalkohol zeigen:

	Chloroform	Äther	Alkohol	Molenverhältnis
Kaulquappen (Overton).	0,0014	0,060	0,29	1 : 42 : 207
Froschherz (Führer) . .	0,007	0,292	1,20	1 : 41 : 172
„ (Dieballa). .	0,010	0,384	2,04	1 : 36 : 192

Wie aus dieser Zusammenstellung ersichtlich, ist das Wirkungsverhältnis von Chloroform zu Äther an Kaulquappen gleich 1 : 42, an Froschherzen gleich 1 : 41. Das Verhältnis Chloroform zu Alkohol zeigt in meinen Versuchen eine etwas größere Abweichung von Overtons Werten; dagegen deckt sich nahezu vollkommen mit diesen das Ergebnis von Versuchen, die früher Dieballa[1]) am Froschherzen unter Verwendung des Williamsapparates gemacht hat. Daß auch im übrigen ein weitgehender Parallelismus zwischen meinen Herznarkosewerten und den Werten Overtons an Kaulquappen besteht, zeigt Tabelle IV.

Im Durchschnitt war in meinen Versuchen, wie die Tabelle IV zeigt, eine etwa 5 mal höhere Narkoticumkonzentration zur Herbeiführung des Herzstillstandes erforderlich als sie Overton zur Narkose von Kaulquappen benötigte, und dies beim Chloroform z. B. in gleicher Weise wie beim Äther.

Die Narkoseversuche am Froschherzen wie die an Kaulquappen, verglichen in ihren Ergebnissen mit der Oberflächenaktivität der Narkotica, zeigen demnach, daß zwar für eine Anzahl Substanzen, die sich um die Reihe der normal-primären Alkohole scharen, wie Äther, Paraldehyd und Aceton, ein auffälliger Parallelismus besteht zwischen Oberflächenaktivität und narkotischer Wirkung, daß dies aber durchaus kein allgemeines Ver-

[1]) G. Dieballa, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 34, 154. 1894.

Tabelle IV.

Narkotische Konzentration.

	Kaulquappen nach Overton Mol. pro Liter	Froschherz nach Führer Mol. pro Liter	Wirkungsunterschied
Methylalkohol	0,52—0,62	3,740	6,6 mal
Äthylalkohol	0,27—0,31	1,206	4 „
Propylalkohol	0,11	0,369	3,4 „
Isopropylalkohol	0,13	0,655	5 „
Butylalkohol, norm.	0,038	0,109	2,9 „
Isobutylalkohol	0,045	0,135	3 „
Butylalkohol, tert.	0,130	0,637	4,9 „
Isoamylalkohol	0,023	0,039	1,7 „
Amylalkohol, tert.	0,057	0,184	3,2 „
Paraldehyd	0,025	0,150	6 „
Aceton	0,26	1,102	4,2 „
Äther	0,06	0,292	4,9 „
Essigsaures Methyl	0,07—0,09	0,257	3 „
„ Äthyl	0,03	0,130	4,3 „
„ Propyl	0,0098—0,012	0,035	3,5 „
„ Isobutyl	0,0057	0,015	2,6 „
Urethan (Äthyl-)	0,037—0,045	0,224	5,5 „
Benzol	0,0021	0,011	5,2 „
Chloreton	0,0008[1])	0,005	6,3 „
Chloralhydrat	0,006	0,030	5 „
Chloroform	0,0014	0,007	5 „
Tetrachlormethan	0,00064—0,0008	0,003	4,2 „
Äthylchlorid	0,004 —0,005	0,046	10 „
Äthylenchlorid	0,0022 —0,0025	0,031	13 „
Äthylbromid	0,0023 —0,0031	0,033	12 „
Äthyljodid	0,0011	0,012	10,9 „

Mittelwert: 5,4 mal

halten der Narkotica ist. Sicherlich bildet für die halogenhaltigen Narkotica der Teilungskoeffizient zwischen Öl und Wasser ein besseres proportionales Maß ihrer Wirkungsstärke als Bestimmungen der Oberflächenaktivität ihrer wässerigen Lösungen. Auch schon die Wasserlöslichkeit derselben geht ihrer narkotischen Wirkung weitgehend parallel, und da bei den in Wasser schwer löslichen Substanzen genaue Bestimmungen von Teilungskoeffizienten direkt kaum ausführbar sind, so besitzen schon die einfachen Löslichkeitsbestimmungen eine gewisse praktische Bedeutung.

Ordnet man alle geprüften halogenhaltigen Narkotica in auf- oder absteigender Reihenfolge ihrer Wirksamkeit am Froschherzen untereinander und daneben ihre Wasserlöslichkeit, so ergibt sich kein vollkommen symbater Verlauf beider Reihen.

[1]) Nach H. Meyer und Baum l. c.

Vergleicht man dagegen die chemisch verwandten Produkte und ordnet dementsprechend zu Gruppen wie in Tabelle V, so ergibt sich vollkommener Parallelismus in der Richtung, daß in

Tabelle V.

Narkotische Konzentration und Wasserlöslichkeit.

	Molekul. Gewicht	Siede-punkt °	Narkotische Konzentration Mol. pro Liter	Löslichkeit Mol. pro Liter
Chloralhydrat	165	97	0,030	4,040
Isopral	163	150	0,009	> 0,104
Chloreton	177	167	0,005	0,028
Methylenchlorid	85	41	0,016	0,209
Chloroform	119	61	0,007	0,063
Tetrachlormethan	154	76	0,003	0,004
Methylenchlorid	85	41	0,016	0,209
Methylenbromid	174	98	0,014	0,065
Chloroform	119	61	0,007	0,063
Bromoform	253	151	0,001	0,005
Äthylchlorid	64	12	0,046	0,088
Äthylenchlorid	99	83	0,031	0,075
Tetrachloräthan	168	135	0,002	0,011
Pentachloräthan	202	159	—	0,0006[1])
Hexachloräthan	237	185	—	0,00007[1])
Methyljodid	142	43	0,064	0,100
Äthyljodid	156	72	0,012	0,025
Propyljodid	170	102	0,005	0,005
Propylbromid	123	71	0,008	0,022
Isopropylbromid	123	60	0,010	0,026
Äthylchlorid	64	12	0,046	0,088
Äthylbromid	108	38	0,033	0,093
Äthyljodid	156	72	0,012	0,025
Propylchlorid	78	46	0,017	0,051
Propylbromid	123	71	0,008	0,022
Propyljodid	170	102	0,005	0,005

jeder der kleinen Gruppen die Wirksamkeit ansteigt mit abnehmender Wasserlöslichkeit. Sinkt die Wasserlöslichkeit unter eine gewisse Grenze, so verschwindet die narkotische Wirkung am Herzen, wie das in der Gruppe der gechlorten Äthane ersichtlich ist.

Die narkotische Wirkung steigt in jeder Gruppe gleichzeitig mit Molekulargewicht und Siedepunkt, die in Tabelle V neben der Wasserlöslichkeit aufgenommen wurden.

[1]) W. Plötz, diese Zeitschr. **103**, 265. 1920.

Die Anordnung der Narkotica in der genannten Weise läßt zugleich andere Gesetzmäßigkeiten in den Gruppen erkennen: Besonders wichtig erscheint, daß die narkotische Wirkungsstärke bei der Chlorsubstitution des Wasserstoffs in Methan und Äthan mit der Anzahl der Chloratome zunimmt: wie in Overtons Versuchen an Kaulquappen ist Tetrachlormethan am Herzen etwa doppelt so wirksam wie Chloroform. Bei Hämolyseversuchen von Plötz[1]) erwies sich das Tetrachlorprodukt als 8—19mal wirksamer wie das Trichlorprodukt. Dagegen war das vollständig gechlorte Produkt in meinen Inhalationsversuchen an Mäusen wie in älteren Versuchen von Kionka[2]) an Kaninchen und von Lehmann[3]) an Katzen weniger wirksam wie das Chloroform, Unterschiede, auf die in einer späteren Arbeit weiter einzugehen ist.

Bei den gechlorten Äthanen steigt die Wirksamkeit bis zum Tetrachlorprodukt, das als Narkoticum des Froschherzens in dieser Gruppe am wirksamsten ist, während Penta- und Hexachlorprodukt zur Herznarkose zu wenig wasserlöslich sind, wie auch zur Hämolyse nach Plötz. Am ganzen Frosch zeigt nach Binz[4]) auch noch das Hexachloräthan, inhaliert, narkotische Wirkung.

Am Froschherzen sind die Bromprodukte wirksamer als die entsprechenden Chlorprodukte. So besitzt Bromoform etwa die doppelte Wirksamkeit des Chloroforms. Am wirksamsten sind die Jodprodukte, wie die beiden Reihen Äthylchlorid, -bromid und -jodid und Propylchlorid, -bromid und -jodid in gleicher Weise zeigen. Ein konstanter Quotient läßt sich aus diesen beiden Reihen und den anderen vergleichend geprüften Substanzen für die Halogensubstitution nicht berechnen. Dagegen ergibt sich, wie Tabelle VI zeigt, für die Glieder homologer Reihen Äthyl- und Propylchlorid, Äthyl- und Propylbromid und Äthyl- und Propyljodid als mittlerer Quotient 3,1 und bemerkenswerterweise für die Wasserlöslichkeit nach eigenen und fremden Bestimmungen 3,4—3,6. Soweit die wenigen geprüften Glieder homologer Reihen Schlüsse gestatten, scheint auch hier

---

[1]) W. Plötz, diese Zeitschr. **103**, 264. 1920.

[2]) H. Kionka, Arch. intern. de Pharmacodyn. et de Thérap. **7**, 494. 1900.

[3]) K. B. Lehmann, Arch. f. Hyg. **74**, 4. 1911.

[4]) C. Binz, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **34**, 199. 1894.

Tabelle VI.

Narkotische Konzentration und Wasserlöslichkeit.

	Narkotische Konzentration		Löslichkeit			
			Eigene Bestimmung		Nach Frey[1]) u. Rex[2])	
	Mol. pro Liter	Q.	Mol. pro Liter	Q.	Mol. pro Liter	Q.
Äthylchlorid . . .	0,046	2,7	0,088[1])	1,7	0,088[1])	2,5
Propylchlorid . .	0,017		0,051		0,035	
Äthylbromid. . .	0,033	4,1	0,093	4,2	0,085	4,2
Propylbromid . .	0,008		0,022		0,020	
Äthyljodid . . .	0,012	2,4	0,025	5,0	0,026	4,3
Propyljodid . . .	0,005		0,005		0,006	
	Mittelwert: 3,1		Mittelwert: 3,4		Mittelwert: 3,6	

am Froschherzen das von mir an anderen homologen Reihen aufgefundene Gesetz der Wirkungszunahme von einem Gliede zum anderen um einen Faktor, der zwischen 3 und 4 liegt, zu gelten, und zwar, wie in meinen Versuchen an Mäusen mit den Kohlenwasserstoffen Pentan, Hexan, Heptan und Octan unabhängig vom capillaren Verhalten, dagegen offenbar parallel der Löslichkeitsabnahme in Wasser.

Besteht unter den genannten Einschränkungen befriedigende Übereinstimmung zwischen Wasserlöslichkeit und narkotischer Wirkungsstärke bei den halogenhaltigen Narkoticis, so fragt es sich, inwieweit beide parallel gehen bei der Vergleichung halogenhaltiger und halogenfreier Substanzen, und dann bei letzteren unter sich.

Da erscheint zunächst das Verhalten von Chloroform und Äther wichtig: Aus Bestimmungen am Froschherzen und an Kaulquappen berechnet sich, wie früher erwähnt, ein Wirkungsverhältnis von etwa 1 : 40. Die Wasserlöslichkeit beider verhält sich dagegen wie 1 : 14 bis 1 : 17. Stimmt dieses Verhältnis mit dem erstgenannten nicht überein, so ist doch zu berücksichtigen, daß unter anderen Bedingungen auch für die pharmakologische Wirkungsstärke der beiden Narkotica andere Werte gefunden werden. Aus den Hämolyseversuchen von Apitz und Kochmann[3]) ergibt sich ein Wirkungsverhältnis von 1 : 26 und in Narkoseversuchen am ganzen Frosch fand ich sogar das Ver-

[1]) E. Frey, diese Zeitschr. **40**, 29. 1912.

[2]) A. Rex, Zeitschr. f. physik. Chemie **54**, 55. 1906.

[3]) G. Apitz und M. Kochmann, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **87**, 227. 1920.

hältnis 1 : 14 wieder. Wenn demnach auch die am Froschherzen erhaltenen Werte mit denen der Wasserlöslichkeit nicht übereinstimmen, so zeigen meine Ausführungen, die in einer späteren Arbeit weiter verfolgt werden sollen, daß es Bedingungen gibt, unter denen diese Übereinstimmung von pharmakologischem Verhalten und Wasserlöslichkeit erhalten wird.

Ein anderes Beispiel mag zeigen, daß auch in homologen Reihen halogenfreier Substanzen Parallelismus besteht. Aus der Wirkungsstärke von Äthyl- und Propylacetat am Herzen (Tabelle I) berechnet sich der Quotient 3,7; aus der Wasserlöslichkeit beider (Tabelle III) 3,6. Doch muß die Wasserlöslichkeit als Maßstab versagen bei Substanzen, die mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar sind, wie Methyl-, Äthyl-, Propylalkohol und Aceton. Um für diese Substanzen Löslichkeitswerte zu erhalten, die den Narkosewerten parallel verlaufen, muß ihre Wasserlöslichkeit herabgesetzt werden, und dies gelingt bekanntlich durch Zusatz von Salzen zu den Lösungen. Dazu eignen sich durchaus nicht alle Salze. Nach meinen Versuchen kommen für vergleichende Bestimmungen an den Narkoticis in erster Linie Calciumchlorid und Kaliumcarbonat in Betracht. Die Tabellen VII und VIII enthalten die Ergebnisse

Tabelle VII.

Löslichkeit in 20 proz. Calciumchloridlösung und narkotische Konzentration.

	Löslichkeit in 20 proz. $CaCl_2$			Narkot. Konzent.	Wirkungsunterschied
	Vol.-Proz.	Gew.-Proz.	Mol. pr. Liter	Mol. pr. Liter	
Äther	4,76	3,43	0,463	0,292	1,6
Paraldehyd . . .	4,75	4,70	0,356	0,150	2,3
Propylalkohol. . .	32,43	26,14	4,356	0,369	11,7
Isoamylalkohol . .	1,57	1,28	0,145	0,039	3,6
Amylenhydrat . .	6,54	5,42	0,615	0,184	3,4
Essigäther	4,40	4,05	0,459	0,130	3,5
Urethan (Äthyl-) .	—	19,04	2,139	0,224	9,7
Benzol	0,14	0,12	0,016	0,011	1,4
Methylenchlorid .	0,99	1,36	0,159	0,016	9,9
Chloroform	0,49	0,75	0,063	0,007	9,0
Methylenbromid .	0,34	0,85	0,049	0,014	3,5
Methyljodid . . .	0,60	1,36	0,096	0,064	1,6
Äthylenchlorid . .	0,40	0,50	0,050	0,031	1,6
Äthylbromid . . .	0,70	1,01	0,093	0,033	3,1
Propylchlorid . .	0,40	0,35	0,045	0,017	2,7

Mittelwert: 4,6

Tabelle VIII.

Löslichkeit in 20proz. Kaliumcarbonatlösung und narkotische Konzentration.

	Löslichkeit in 20 proz. K_2CO_3			Narkot. Konzent. Mol. pr. Liter	Wirkungsunterschied
	Vol.-Proz.	Gew.-Proz.	Mol. pr. Liter		
Äther	1,96	1,41	0,191	0,292	0,6
Paraldehyd . . .	0,99	0,98	0,074	0,150	0,5
Aceton	19,36	15,46	2,665	1,102	2,4
Äthylalkohol . . .	31,51	24,95	5,423	1,206	4,5
Propylalkohol. . .	7,41	5,97	0,995	0,369	2,7
Isoamylalkohol . .	0,34	0,27	0,031	0,039	0,8
Amylenhydrat . .	1,96	1,62	0,184	0,184	1,0
Essigäther	2,34	2,16	0,245	0,130	1,9
Urethan (Äthyl-) .	—	8,82	0,991	0,224	4,5
Benzol	0,80	0,07	0,009	0,011	0,9
Methylenchlorid .	0,50	0,68	0,080	0,016	5,0
Chloroform	0,30	0,45	0,038	0,007	5,4
Methylenbromid .	0,14	0,35	0,020	0,014	1,4
Methyljodid . . .	0,50	1,14	0,080	0,064	1,3
Äthylenchlorid . .	0,22	0,27	0,027	0,031	0,9
Äthylbromid . . .	0,60	0,87	0,080	0,033	3,0
Propylchlorid . .	0,42	0,37	0,047	0,017	2,8
				Mittelwert:	2,2

einer Anzahl derartiger Bestimmungen mit den beiden Salzen in 20proz. Lösung. Die Tabellen enthalten außer den Angaben über die Löslichkeit der Narkotica in den Salzlösungen die narkotische Konzentration für das Froschherz und den durch Division der Löslichkeit durch die Wirkungsstärke gewonnenen Wirkungsunterschied.

Die Löslichkeit der Narkotica, in Wasser sowohl wie in der filtrierten Lösung von trockenem Calciumchlorid und Kaliumcarbonat, wurde in einfachster Weise dadurch bestimmt, daß zu entsprechenden Mengen (meist 50 oder 100 ccm) in einem Meßzylinder mit Glasstöpsel mit der Pipette abgemessene oder abgewogene Mengen des Narkoticums solange zugesetzt wurden, als beim Umschütteln vollständige Lösung erfolgte. Wie für die Wasserlöslichkeit aus Tabelle III ersichtlich ist, in der zur Vergleichung Werte nach Rex, Rothmund u. a. aufgenommen wurden, ergab sich für unsere Zwecke ausreichende Genauigkeit der Resultate.

In beiden Tabellen fehlt der Methylalkohol, der zwar durch viel Kaliumcarbonat „aussalzbar" ist, aber sich in der gebrauchten 20proz. Lösung nicht abscheidet. Durch Calciumchlorid kann offenbar weder Methyl- noch Äthylalkohol aus seiner Lösung verdrängt werden, sondern erst der Propylalkohol. Erscheint demnach von vornherein das Kaliumcarbonat für die Versuche

geeigneter, so muß doch betont werden, daß manche Produkte, wie Chloralhydrat oder Isopral, infolge der stark alkalischen Reaktion der Lösung rasch zersetzt werden und eine Löslichkeit überhaupt nicht bestimmt werden kann, während aus dem gleichen Grunde andere Produkte, wie die Ester, zu hohe Werte ergeben. Das Calciumchlorid dagegen löst sich in manchen der organischen Substanzen und verdrängt dieselben darum nicht entsprechend aus ihrer Lösung. Vielleicht liefert eine Mischung von Calciumchlorid mit einem anderen Elektrolyten oder Nichtelektrolyten Löslichkeitswerte, die mit den narkotischen Konzentrationen besser parallel gehen als die gefundenen. Inwieweit narkotische Konzentration, Wasserlöslichkeit, Löslichkeit in 20proz. $CaCl_2$ und K_2CO_3 symbat verlaufen, zeigt am besten eine Zusammenstellung, in der die Substanzen nach ihrer narkotischen Wirkungsstärke angeordnet sind (Tabelle IX).

Tabelle IX.

Narkotische Konzentration, Wasserlöslichkeit und Löslichkeit in $CaCl_2$- und K_2CO_3-Lösung.

	Narkot. Konzent. Mol. pro Liter	Wasserlöslichkeit Mol. pro Liter	Löslichkeit in $CaCl_2$ 20proz. Mol. pro Liter	Löslichkeit in K_2CO_3 20proz. Mol. pro Liter
Äthylalkohol	1,20	mischbar	mischbar	5,42
Aceton.	1,10	„	„	2,66
Propylalkohol. . . .	0,37	„	4,36	0,99
Urethan	0,22	11,23	2,14	0,99
Äther	0,29	0,87	0,46	0,19
Amylenhydrat . . .	0,18	1,42	0,61	0,18
Paraldehyd	0,15	0,91	0,36	0,07
Essigäther	0,13	0,73	0,46	0,24
Methyljodid	0,06	0,10	0,09	0,08
Isoamylalkohol . . .	0,04	0,23	0,14	0,03
Äthylbromid	0,03	0,09	0,09	0,08
Äthylenchlorid . . .	0,03	0,07	0,05	0,03
Propylchlorid . . .	0,017	0,051	0,045	0,047
Methylenchlorid. . .	0,016	0,209	0,159	0,080
Methylenbromid . .	0,014	0,065	0,049	0,020
Benzol	0,011	0,018	0,016	0,009
Chloroform	0,007	0,063	0,063	0,038

Wie schon bei Besprechung der halogenhaltigen Narkotica in Tabelle V hervorgehoben wurde, zeigt eine solche Anordnung weder für diese Gruppe allein noch auch für die halogenfreien Produkte vollständiges Gleichgehen der Werte für Narkose und Wasserlöslichkeit, und hierin zeigt sich auch keine durchgreifende

Änderung bei den Bestimmungen der Löslichkeit in Salzlösungen. Bemerkenswert bleibt immerhin auch in dieser Zusammenstellung, daß sich für Narkose und Löslichkeit Werte entsprechender Größenordnung fast ausnahmslos ergeben. Dividiert man, wie in Tabelle VII und VIII, die Löslichkeit durch die narkotische Konzentration, so gelangt man bei der Calciumchloridlösung zu einem Mittelwerte von 4,6, bei der Kaliumcarbonatlösung zu einem solchen von 2,2. Beim Calciumchlorid liegen die einzelnen Werte zwischen 1,6 und 11,7, beim Kaliumcarbonat zwischen 0,5 und 5,4. Vergleicht man hiermit Werte, wie sie von Meyer und Gottlieb-Billroth[1]) durch Multiplikation der narkotischen Konzentration für Kaulquappen mit den Teilungskoeffizienten zwischen Öl und Wasser erhalten wurden, so zeigen diese durchaus keine größere Übereinstimmung als die hier gefundenen Zahlen.

Nach den Genannten erhält man für die Narkotica Werte, die ihrer Wirkungsstärke proportional sind bei Bestimmung ihrer Löslichkeitskoeffizienten in Öl. Eine Bestimmung des Teilungskoeffizienten zwischen Öl und Wasser erscheint überflüssig. Die Wirkungsstärke eines Narkoticums ist aber physikalisch-chemisch auch in seiner wässerigen Lösung meßbar: dies ergibt sich für eine Anzahl Substanzen aus dem Parallelgehen von Oberflächenaktivität der wässerigen Lösung und Wirkungsstärke nach Traube, für die meisten aus Bestimmungen ihrer Löslichkeit in reinem Wasser oder in Salzlösung, wie dies hier gezeigt werden konnte.

Zusammenfassung.

Am isolierten Froschherzen wurde, vergleichend mit Äthylalkohol von 7 Vol.-Proz., die isonarkotische Konzentration von 40 teils halogenfreien, teils halogenhaltigen Substanzen bestimmt. Daneben wurde die Tropfenzahl der narkotischen Verdünnung in Traubes Stalagmometer gemessen.

Als stark oberflächenaktiv erwiesen sich in narkotischer Konzentration die Alkohole und ihre Derivate Paraldehyd, Aceton und Äther. Verhältnismäßig weniger beeinflussen die Ester die Oberflächenspannung des Wassers, und capillarinaktiv,

[1]) K. H. Meyer und H. Gottlieb-Billroth, Zeitschr. f. physiol. Chemie **112**, 65. 1920.

nicht nur in narkotischer Verdünnung, sondern auch in gesättigter wässeriger Lösung, sind das Benzol und die Mehrzahl der halogenhaltigen Narkotica. Bestimmungen der Oberflächenaktivität nach Traube ergeben demnach, abgesehen von den Alkoholen und ihren Verwandten, keinen proportionalen Maßstab für die narkotische Wirkungsstärke. Dagegen verläuft die Reihe der narkotischen Konzentrationen am Froschherzen der Wasserlöslichkeit oder besser der Löslichkeit in Salzlösungen annähernd parallel derart, daß mit abnehmender Löslichkeit der Wirkungsgrad ansteigt.

Zur Kenntnis der Lipase von Aspergillus niger (van Tiegh.).

Von

Robert Schenker.

(Aus der botanischen Anstalt der Universität Basel.)

(Eingegangen am 2. Mai 1921.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Bei der Vergärung der Fette spielen bekanntlich die Schimmelpilze im Verein mit den Bakterien eine wichtige Rolle. Durch ihre Vermittlung werden die Fette gespalten und so der weiteren Zersetzung zugänglich gemacht.

Die Arbeiten von Rubner (1900) und Schreiber (1905) zeigen, daß im Boden Fett gespalten und aufgezehrt wird, während steriles Fett in sterilisiertem Boden nur eine minimale Spaltung erleidet. In einer Nährlösung, die 1% Fleischextrakt, 1% Pepton, Butterfett und außerdem $CaCO_3$ enthält, werden nach Beimpfung mit Boden 86,9% Fettsäuren aus dem ursprünglich darin vorhandenen Fett abgespalten. Dabei konnten Pilze und Bakterien isoliert werden, die besonders emulgiertes Fett gut verarbeiteten. Damit ist die Fettzersetzung im Boden als mikrobiologischer Prozeß erwiesen.

Daß auch am Zersetzungsprozesse feuchter, fetthaltiger Nahrungs- und Futtermittel die Schimmelpilze regen Anteil nehmen, zeigen die Arbeiten von Ritthausen und Baumann (1896), Haselhoff und Mach (1906), Biffen (1899), Roussy (1909), König, Spieckermann und Bremer (1901) usw. Für die Zersetzung des Butterfettes und des Käsefettes weisen die Arbeiten von Hanus und Stocky (1900), Laxa (1902) und Rahn (1906) die Wichtigkeit der Schimmelpilze und Bakterien nach.

Auch Organfette können durch Schimmelpilze intensiv zersetzt werden. So zeigte Ohta (1911), daß Actinomucor repens in sterilem Leberpulver nach 2 Wochen 40% und nach 3 Wochen sogar 54—63% hoher Fettsäuren verzehrte.

Bei der Fettvergärung lassen sich 2 wichtige Phasen unterscheiden. Vorerst findet eine Hydrolyse der Glyceride statt und dann die Verarbeitung ihrer Komponenten.

Daß die Hydrolyse der Fettsäureglyceride durch die Schimmelpilze auf einem enzymatischen Vorgang beruht, beweisen die Untersuchungen von Camus (1897), Biffen (1899), König, Spieckermann und Bremer (1901), Went (1901), Laxa (1902), Garnier (1903). Ein eingehendes Studium der Lipase, wie es z. B. Rouge bei Lactarius sanguifluus (Fr.) durchgeführt hat, liegt aber für Schimmelpilze noch nicht vor.

Die Lipase, die Biffen (1899) aus einer auf Cocosnüssen gewachsenen Nectriacee gewann, spaltete sowohl Cocosnußfett als auch Monobutyrin. Laxa (1902) gewann aus Penicillium und Mucor einen Saft, der Butterfett und Monobutyrin hydrolysierte, während der Saft von Oidium lactis nur auf Monobutyrin spaltend wirkte. Schnell (1912) wies jedoch auch bei diesem Pilze nach der Eijkmannschen Methode die Fähigkeit einer wirklichen Fettspaltung nach. Diese Versuche zeigen, daß wahrscheinlich eine echte Phytolipase vorliegt, durch die besonders die hochmolekularen Fettsäureglyceride intensiv gespalten werden. König, Spieckermann und Bremer (1901) fanden jedoch, daß Glycerinauszüge von Eurotium repens und Oidium nur auf Monobutyrin merkbar wirkten, während die Einwirkung auf Baumwollsamenöl nicht deutlich war.

Über die Löslichkeits- und Diffusionsverhältnisse der Schimmelpilzlipasen lassen sich aus der Literatur ebenfalls einige Anhaltspunkte gewinnen. Camus (1897) fand das neutralisierte Filtrat einer Raulinschen Nährlösung, die mit Penicillium glaucum beimpft war, schwach lipolytisch wirksam. Desgleichen wirkten die Kulturfiltrate von Aspergillus niger spaltend auf Monobutyrin ein. Außerdem fand Garnier (1903) die Kulturfiltrate einer Reihe von Sterigmatocystis- resp. Aspergillusarten lipaseaktiv. Das Kulturfiltrat einer Glycerin-Arachisölkultur von Monilia sitophila enthält nach Went (1901) ebenfalls Lipase. Diese Resultate zeigen somit, daß die Lipase dieser Pilze durch die Zellmembran in die Nährlösung diffundiert.

Ferner beweisen die Versuche von Garnier (1903), daß die Lipase auch auf fettfreien Substraten gebildet wird.

Da alle bis jetzt vorliegenden Untersuchungen über die Fettspaltung durch Schimmelpilze immer nur einzelne Tatsachen konstatiert haben, stellte ich mir auf die Anregung von Herrn Dr. Bassalik, bis 1918 Assistent am botan. Institut in Basel, die Aufgabe, die Eigenschaften der Lipase von Aspergillus niger van Tiegh. möglichst umfassend zu studieren und den Zusammenhang zwischen Wachstum und Lipasebildung bzw. der Lipasewirkung festzustellen. Die Arbeit wurde in der Zeit vom Wintersemester 1918 bis Sommersemester 1920 ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Bassalik für die Anregung zur Arbeit und für die Einführung in die Methodik zu danken,

ebenso Herrn Prof. Senn, der mich bei der Durchführung der Arbeit mit seinem Rat unterstützte.

I. Kultur von Aspergillus niger.

1. Das Versuchsmaterial.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde ein aus der Laboratoriumsluft isolierter Stamm von Aspergillus niger (van Tieghem) verwendet.

Brenner (1914) hat bei dieser Spezies mehrere morphologisch und physiologisch verschiedene Rassen beschrieben. Um meinen Stamm mit einer dieser Rassen identifizieren zu können, ließ ich den Pilz unter den gleichen Kulturbedingungen wie Brenner wachsen. Diese Kulturen ergaben die Identität meines Stammes mit Brenners Rasse β, die sich durch große Mycelproduktion und intensive Sporenbildung auszeichnet. Auch mit dem durch van Tieghem (1867) beschriebenen Aspergillus niger erwies sich der von mir kultivierte Stamm als völlig identisch.

Ich arbeitete ausschließlich mit diesem Stamm des Aspergillus niger van Tieghem, der bei Zimmertemperatur auf schrägem Agar von folgender Zusammensetzung fortgezüchtet wurde:

1000 ccm Leitungswasser
10 g Rohrzucker
5 „ Pepton Witte (16% N)
1 „ KH_2PO_4
15 „ pulv. Agar.[1])

2. Nachweis der Fettbildung von Asp. niger.

Der Tabelle I, in welcher die Resultate verschiedener Forscher über das Wachstum der Schimmelpilze auf Fetten zusammengestellt sind, hauptsächlich den Arbeiten von Schmidt (1891) und Bremer (1901), können wir entnehmen, daß Aspergillus niger befähigt ist, die Glyceride der höheren Fettsäuren als Kohlenstoffquelle zu verwenden und daß er dabei, wie Schmidt quantitativ nachwies, die Fette in ihre Komponenten: Fettsäure und Glycerin, spaltet.

In meinen Versuchen habe ich zunächst das Verhalten meines Aspergillusstammes gegen Fette geprüft.

Nach Brenner (1914) und Elfving (1920) zeigen die verschiedenen Rassen von Aspergillus niger in ernährungsphysiologischer Hinsicht so große Differenzen, daß diese Voruntersuchung notwendig war.

[1]) Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammten von Merck (Darmstadt), Kahlbaum (Zürich) oder König (Leipzig).

Tabelle I.

Versuchsergebnisse verschiedener Forscher über das Wachstum einiger Schimmelpilze auf Fetten.

Autor	Pilz	Substrat	Wachstum	Bemerkungen
van Tieghem 1880	Saccharomyces	Olivenöl	+	Verseifung des Öles
„ „ 1881	„ olei	„		
	Bierhefe	„	—	
	Mucor spinosus	„	+	
	M. plecerocystis	„	+	An älteren Mycelpartien Krystalle von Fettsäuren.
	Verticillium	„	+	
	Choetonium	„	+	
	Sterigmatocystis	„	+	
	Penicill. glaucum	„	+	
Kirchner 1888	Elaeomyces olei	Mohnöl	+	Lebhaftes Wachstum.
Schmidt 1891	Aspergillus	Mandelöl	+	Kein freies Glycerin i. d. Nährlösung. Wiedergewonnenes Öl. Hohe Säurezahl.
	Penicillium			
	Mucor racemosus			
Wehmer 1891	Asp. niger	Olivenöl 1,5 g	+ Trockengew. 0,80 g	0,194 g Oxalsäure gebildet.
Biffen 1899	Schimmelpilz (Hypocreales)	Cocosnußmilch	+	Neutrale, mit Lackmus gefärbte Kultur rot verfärbt durch Wirkungen der auf der Oberfläche schwimmenden Mycelflocken.
Went 1901	Monilia sitophila	Butterfett	+	Rascheres Wachstum bei Zugabe von 2,5% Glycerin neben 5% Fett. Lipase in der Nährlösung.
		Arachisöl	+	
		Olivenöl	+	
König, Spieckermann, Bremer 1901	Penicill. glaucum Asp. flavus usw.	Höhere Glyceride	+	
Roussy 1909	Verschiedene Schimmelpilze	Raulin'sche Nährlösung	+	Wachstumsbeginn: 2% Fett
	Asp. niger	+ Gelatine	+	Optimalkonzentration: 6—10% Fett
	Penicill. glaucum	+ Schweineschmalz	+	Maximalkonzentration: 30—40% Fett.
Roussy 1911	„ „	Fettsäuren, Glycerin	+	Im allgem. Fettsäuren besser nährend als Glycerin. Bei Asp. u. Pen. glaucum Fettsäuren ebensogut wirkend wie das Glycerin.

Dabei verwendete ich folgende Nährlösung:

1000 ccm dest. Wasser
1 g NH_4Cl
1 „ K_2HPO_4
0,5 g $MgSO_4\,7\,H_2O$.

Wenn Öl als einzige Kohlenstoffquelle geboten wird, darf die Konzentration nicht zu groß sein, weil sonst leicht die ganze Oberfläche mit einer geschlossenen Ölschicht bedeckt wird, die ein Auskeimen der Sporen resp. ein Wachstum verhindert. Wie schon Schmidt (1891) hervorhebt,

bilden sich bei einer Konzentration von 0,5% Öl auf der Nährlösung nur unzusammenhängende Tropfen.

In kleine Erlenmeyerkölbchen wurden je 10 ccm obengenannter Nährlösung abpipettiert und 0,5% Olivenöl zugesetzt. Eine Serie enthielt kein Öl, eine andere kein NH_4Cl, eine letzte nur Öl, um die Reinheit der Nährsalze und des Öles, das vorher filtriert worden war, zu kontrollieren. Die mit Wattepfropf versehenen Kulturen wurden im Dampftopf bei ca. 98° $^1/_2$ Stunde sterilisiert. Diese Sterilisationsdauer genügte, denn die unbeimpften Kontrollkölbchen blieben mehrere Wochen steril. Nach dem Erkalten wurden von jeder Serie je 3 Kölbchen beimpft und mit den unbeimpften Proben in den dunkeln Thermostaten von 27° C gestellt. Die Nährlösung zeigte bei Versuchsbeginn gegen Lackmus neutrale oder schwach alkalische Reaktion. Das alkalische K_2HPO_4 wurde deshalb als Phosphor- und Kaliumquelle gewählt, damit es bei der Fetthydrolyse etwa auftretende Säuren neutralisiere und einer zu starken Aciditätszunahme in der Nährlösung vorbeuge; außerdem konnte auf diese Weise der Reaktionsverlauf während der Entwicklung des Pilzes bequem verfolgt werden. Vom Beginn der Impfung an wurde die Reaktion der Nährlösung gegen Lackmus täglich untersucht.

Nach 3—4 Tagen erschienen in den Kulturen mit der vollständigen anorganischen Nährlösung und Öl als C-Quelle die ersten Mycelflocken; in den (unbeimpften) Kontrollen trat selbst nach einem Monat keine Pilzentwicklung ein. Mit zunehmendem Wachstum nahm auch die Acidität der Nährlösung zu; und als der Versuch nach einem Monat abgebrochen wurde, war die Nährlösung deutlich sauer. Die negativen Resultate der anderen Serien sprechen für die Reinheit der angewendeten Nährsalze und des Öles. Unter sonst gleichen Bedingungen zeigte Aspergillus Wachstum auf Ricinusöl, Mandelöl (Amygdalus communis), Haselnußöl (Corylus avellana), Walnußöl (Juglans regia), ferner auf Butter, Rindertalg, Schweinefett und Kakaobutter. — Auf letzterer war das Wachstum am schwächsten; die Kulturen hatten das gleiche Aussehen wie die später zu erwähnenden, welche Tristearin und Tripalmitin und die zugehörigen Fettsäuren als C-Quellen enthielten. Die Mycelproduktion war hier äußerst gering, während starke Sporenbildung einsetzte.

Die Ölkulturen zeigen durchwegs ein sehr charakteristisches Aussehen. Jeder einzelne Öltropfen ist von einem Mycelring umgeben.

Schmidt (1891) hat diese Wachstumsweise in seiner Arbeit ausführlich beschrieben und ihre Entstehung im hängenden Tropfen mikroskopisch verfolgt. In meinen Kulturen beobachtete ich genau dieselben Bilder.

Endlich mußte noch die Ursache der Acidität in den Ölkulturen untersucht werden.

Es wäre vor allem denkbar, daß infolge der Sterilisation und der nachherigen langen Berührung mit der mineralischen Nährlösung eine Spaltung des Öles eingetreten wäre. Schmidt (1891) verfolgte die Wirkung der Sterilisation quantitativ und wies nach, daß durch diesen Prozeß keine merkliche Spaltung des Öles eintritt. Da die von mir benützte Nährlösung eine andere Zusammensetzung als diejenige Schmidts hatte, untersuchte ich die Wirkung der Sterilisation auf Olivenöl ebenfalls. Das verwendete Olivenöl hatte die Säurezahl 2,9 und die Verseifungszahl 192,0, welche Daten nach den im Schweiz. Lebensmittelbuch (III. Aufl. S. 47) angegebenen Methoden gewonnen wurden. Erlenmeyerkolben, die 100 ccm Nährlösung und 0,5% Olivenöl enthielten, wurden 1 Stunde im strömenden Dampf sterilisiert und unbeimpft 12 Tage bei einer Temperatur von 35° C dunkel gehalten. Hierauf wurde das Öl durch Ausschütteln mit Äther wiedergewonnen und nach dem Trocknen auf seine Säurezahl untersucht, die nun 8,4 war. Die Säurezahl hatte somit um 5,5 zugenommen. Dieser Versuch zeigt, daß das dem Pilz in der Nährlösung dargebotene Öl nur zu einem minimen Teile schon vor der Beimpfung gespalten war.

Gleichzeitig wurde ein Parallelversuch mit nach der Sterilisation beimpften Kolben ausgeführt[1]). Das zurückgewonnene Öl bereitete der Bestimmung der Säurezahl Schwierigkeiten, da es durch den aus den Sporen austretenden Farbstoff (Aspergillin) schwarzbraun verfärbt war. Durch wiederholtes Ausschütteln mit Wasser konnte jedoch das Öl ziemlich gut entfärbt werden. Von diesem verbrauchten 1,3400 g 20 ccm $^n/_{10}$-KOH somit beträgt die Säurezahl:

$$SZ = \frac{20 \cdot 5{,}61}{1{,}340} = 83{,}7$$

Davon sind zu substrahieren (Sterilisationswirkung) . . .	5,5
bleibt Säurezahl, durch Pilztätigkeit hervorgerufen . .	78,2

= 41,1% freie Fettsäuren.

Somit ist erwiesen, daß der Pilz in einer anorganischen Nährlösung mit Olivenöl als C-Quelle eine Anreicherung der freien Fettsäuren des Öles bewirkt. Die in der Nährlösung gefundene Acidität rührt wohl nicht von der Ölsäure oder anderen hochmolekularen Fettsäuren her, vielmehr könnten gleichzeitig niedere Fettsäuren oder auch Oxalsäure entstanden sein, welch letztere Wehmer (1891) bei Aspergillus niger mit Olivenöl als C-Quelle nachgewiesen hat.

Um die Frage nach der Ursache der Acidität zu entscheiden, habe ich in Kulturkolben nach Granger von 500 ccm Inhalt (F. Z. Glas), die 100 ccm Nährlösung und 0,5 g Olivenöl enthielten, nach halbstündiger Sterilisation

Sporen ausgesät und die Kulturen 11 Tage bei 35° C dunkel gehalten. Nun wurden die filtrierten und mit HCl angesäuerten Nährlösungen einiger Kulturen der Wasserdampfdestillation unterworfen, um etwaige flüchtige Säuren zu fassen. Die Prüfung auf Säuren fiel jedoch im Destillat negativ aus.

Nun prüfte ich noch nach der von Wehmer (1891; S. 276) angegebenen Methode auf Oxalsäure; da ich dabei eine kräftige Oxalatfällung erhielt, ist es offenbar die Oxalsäure, welche in erster Linie in den neutralen resp. schwach alkalischen Nährlösungen die Acidität verursacht.

Des weiteren suchte ich festzustellen, auf welchen Komponenten der Fette die Oxalsäurebildung erfolgt. Daß Aspergillus niger mit Glycerin Oxalsäure bildet, hat Wehmer (1891) nachgewiesen.

Ich führte außerdem einen Parallelversuch mit Ölsäure einerseits und mit Glycerin anderseits aus. Es wurden deshalb mit der oben angegebenen Nährlösung 2 Kulturserien mit 0,5% Glycerin und 0,5% Ölsäure angesetzt. Die Versuchsdauer betrug 9 Tage (Temp. 30° C). In dieser Zeit hatte sich auf den Glycerinkulturen eine lockere Myceldecke gebildet, während sich um die Ölsäuretropfen einzelne Flocken angesammelt hatten. In beiden Fällen war das Wachstum gering. Leider gingen mir die Niederschläge zugrunde, bevor ich sie quantitativ zu bestimmen vermochte.

Die lipolytische Fähigkeit von Aspergillus niger habe ich auch noch nach anderen, jedoch nur qualitativen Methoden nachgewiesen.

Söhngen (1910, S. 698) hat zum Nachweis der Bakterienlipase folgende Methode verwendet. Die Innenseite steriler Reagensgläser wird in der Wärme mit einem festen Fett, etwa Rindertalg, überzogen; nach dem Erkalten wird sterile Nährlösung zugegeben und beimpft. Die Talgschicht ist bei Versuchsbeginn homogen, schwach grauweiß und durchscheinend. Die von den Mikroorganismen abgeschiedene Stearinsäure macht das Fett weiß, undurchsichtig und brüchig. Ein Vergleich mit einem unbeimpften Röhrchen läßt dann entscheiden, ob eine Lipolysewirkung eingetreten ist.

Zu meinen Versuchen benützte ich Erlenmeyerkölbchen, Rindertalg und die oben angegebene, mineralische Nährlösung. Die Kölbchen enthielten 10 ccm Nährlösung und wurden 3 Wochen bei 20° dunkel gehalten. Das Pilzmycel entwickelte sich nun, wie zu erwarten war, an der Berührungsstelle von Talgschicht und Nährlösung. Nach einigen Tagen begann sich von der Berührungsstelle mit der Flüssigkeitsoberfläche her ein weißer Verseifungsring zu bilden, der rasch breiter wurde. Nach 12 Tagen war die ganze Talgschicht weiß, krümelig und undurchsichtig und ließ sich mit der Pinzette als zusammenhängender Mantel von der Gefäßwand leicht abheben. Die mikroskopische Prüfung dieser Decke ergab eine vollständige, netzartige Durchwachsung der Fettschicht durch die Pilzhyphen. Die

sterilen Proben dagegen zeigten eine unveränderte, durchscheinende Talgschicht, die höchstens an der Berührungsstelle mit der Flüssigkeitsoberfläche einen schwach weißen, etwa 0,5 mm breiten Streifen aufwies. Diese und alle folgenden Kulturen wurden mikroskopisch unter Anwendung der Ölimmersion auf absolute Reinheit untersucht und nur die Resultate solcher Kulturen berücksichtigt, die sich nach Versuchsabschluß als bakterienfrei erwiesen hatten.

Auch nach der Eijkmannschen Diffusionsmethode reagiert Aspergillus niger lipaseaktiv. Als Fett benutzte ich Rindertalg, der in Petrischalen gegossen und mit Agar von der obenerwähnten Zusammensetzung bedeckt wurde. Es wurde nun eine Anzahl solcher Fettagarplatten, neben einer Reihe unbeimpfter Platten, in den dunklen Thermostaten von 27° C gestellt. Die Kulturen zeigten sofort starkes Wachstum, nach 4—5 Tagen beginnt sich die unter den Kolonien gelegene Talgschicht weiß zu verfärben, was auf Verseifung zurückzuführen ist. Diese nimmt nun an Intensität rasch zu, und am 8. Tage war die fragliche Talgschicht vollständig weiß und brüchig geworden und ließ sich leicht vom Schalenboden abheben. Die Verseifung wird durch die von den Pilzkolonien abgeschiedene und durch Agar diffundierende Lipase verursacht. In den Kontrollplatten konnte gleichzeitig keine Veränderung der Talgschicht konstatiert werden.

8. Kultur von Aspergillus niger auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Die Versuche mit Fettsäuren, Glycerin und Estern hatten den Zweck, das Wachstum auf den hochmolekularen Fettsäuren und Glycerin zu untersuchen und den Nährwert dieser Stoffe zu bestimmen und um festzustellen, ob z. B. nur Glyceride oder auch andere Ester als C-Quelle in Frage kommen. Nachher werde ich dann die Wirkung der Lipase auf diese Ester untersuchen, um festzustellen, ob Ester, die sich als für den Pilz untaugliche C-Quellen erwiesen haben, von der Lipase nicht gespalten werden.

Die C-Quelle wurde in einer Konzentration von 0,5% jeweilen 10 ccm der erwähnten mineralischen Nährlösung zugesetzt und in Erlenmeyerkölbchen ca. 30 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Wenn möglich wurden immer 2 Versuchsserien ausgeführt, die sich durch ihre Versuchsdauer unterschieden (1 Woche und 3—4 Wochen), um etwaige Zufälligkeiten im Wachstum zu erkennen. Jede Serie enthielt wieder 3 Parallelreihen. Außerdem wurden unbeimpfte Kölbchen als Kontrollen verwendet und endlich je eine kleine Menge der mineralischen Nährlösung und der C-Quelle für sich beimpft, um ihre Reinheit zu prüfen. Die Kulturen wurden im Dunkelzimmer bei 19—20° C gehalten. Über die Stärke der Entwicklung geben eigentlich nur Trockengewichtsbestimmungen Aufschluß. Dabei müßten die C-Quellen in bezug auf den Kohlenstoff äquivalent sein und es müßten die Trockengewichte unter Berücksichtigung der Zeit miteinander verglichen werden. Solche quantitative Bestimmungen habe ich nicht ausgeführt, da sie für meine Zwecke nicht notwendig waren. Ich habe mich

deshalb beschränkt, die Intensität des Wachstums abzuschätzen. Die auf diese Weise erhaltenen Resultate sind deshalb nur Vergleichswerte, gestatten jedoch als solche einen annähernden Schluß auf die Tauglichkeit der verwendeten Stoffe als C-Quelle zu ziehen.

In den nachfolgenden Tabellen wird durch 3 Kreuze das beste, durch ein Kreuz das schwächste Wachstum bezeichnet.

a) Kultur auf Fettsäuren und Glycerin.

Tabelle II.

Beimpfung ab Ag-Kultur: 31. I. 1919.

Datum	Ricinusöl	Glycerin	Ölsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure
3. II.	−	−	+	+	+
11. II.	+++	++	++	+	+

Tabelle III.

Beimpfung: 5. III. 1919.

Datum	Ricinusöl	Glycerin	Ölsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure
7. III.	+	+	+	− ?	− ?
10. III.	+	++	++	+	+
13. III.	++	+++	++	+	+
17. III.	+++	+++	++	+	+
25. III.	+++	+++	++	+	+
Reakt.	sauer	stark sauer	sauer	schwach sauer	schwach sauer

Aus Tabelle II und III geht hervor, daß das Wachstum auf den Fettsäuren schwächer ist als dasjenige auf Öl und auf Glycerin. Von den Fettsäuren erlaubte Ölsäure das beste Wachstum. Die bei Versuchsbeginn neutrale Reaktion machte einer sauren Platz, welche bei Glycerin am stärksten, bei Palmitin- und Stearinsäure dagegen am schwächsten war. Die Ölsäurekulturen zeigten bald die für die Ölkulturen charakteristischen Umrahmungsbilder. Auf Palmitinsäure und Stearinsäure bildete der Pilz fast nur Sporangienträger aus, die auf der Oberseite der auf der anorganischen Nährlösung schwimmenden Fettsäureblättchen ausgebildet wurden.

b) Kultur auf verschiedenen Estern.

Die mit Wasserdampf nicht flüchtigen Ester wurden vor dem Sterilisieren in die Kölbchen gegeben, die flüchtigen erst nachher mit steriler Pipette. Von den unlöslichen Estern war bei Versuchsabbruch

jeweilen noch ein Teil im ungelösten Zustande vorhanden; es hätten also dem Pilze genügend C-Verbindungen zur Verfügung gestanden. Die Konzentration betrug 0,5 %

Tabelle IV.

Wachstum auf verschiedenen Estern.

	I. Serie: 8. III.—10. III.	II. Serie: 4. VII.—29. VII.
Ricinusöl		+ + +
Triolein		+ + +
Tripalmitin		+ +
Tristearin		+ +
Triacetin	+	+ + +
Monobutyrin	—	—
Buttersäureäthylester	—	—
Malonsäureäthylester	—	—
Bernsteinsäureäthylester	—	—
Benzoesäureäthylester	—	—

Unter diesen Bedingungen tritt also Wachstum auf den Triglyceriden der Fettsäuren ein. Von diesen Estern zeigte Triacetin das rascheste und stärkste Wachstum, doch ist hier die Sporenbildung relativ geringer als bei den Kulturen mit Öl, Triolein, Tripalmitin und Tristearin. Die Triacetinkulturen reagieren nach kurzer Zeit sauer gegen Lackmus und entwickeln Essigsäuregeruch. Das Wachstum auf den Triglyceriden der Palmitin- und Stearinsäure unterscheidet sich nicht wesentlich von demjenigen auf den entsprechenden freien Säuren; wie bei diesen tritt intensive Sporenbildung ein. — Auf Monobutyrin gedieh der Pilz ebenfalls nicht, obschon, wie wir sehen werden, seine Lipase diesen Ester intensiv zu spalten vermag. Ich behalte mir vor, diese Versuche über den Nährwert verschiedener anderer Ester später weiter auszudehnen.

II. Die Lipase von Aspergillus niger.

1. Darstellungsmethoden.

Camus (1897) und Garnier (1903) wiesen nach, daß die Fettspaltung durch Aspergillus niger enzymatischen Charakter hat. Die Ergebnisse dieser und vieler anderer Forscher, die sich mit Pilzlipasen beschäftigten, zeigen, daß diese leichter darzustellen sind als die Lipasen der höheren Pflanzen. Camus (1897) und Garnier (1903) fanden die Nährlösung lipolytisch wirksam, ebenso Deleano (1909), der bei Lactarius sanguifluus 2 Lipasen unterschied, eine wasserlösliche und eine im Mycel verbleibende. Wässerige Auszüge verwendeten Biffen (1899), König, Spieckermann und Bremer (1901). Rouge (1907) erhielt das wirksamste Präparat dadurch,

daß er die Mycelien mit Sand und Glycerin zerrieb und hierauf bei 37° C 24 Stunden lang digerieren ließ. Nachher setzte er für 1 Volumen Glycerin 1 Volumen Wasser zu und preßte den Saft aus. Laxa (1902) zerrieb Mycelien und preßte dann den Brei durch feine Leinwand. Das Präparat spaltete sowohl Monobutyrin als auch Butterfett.

2. Quantitativer Nachweis der Lipasewirkung.

Als Maß für die Wirkung der Lipase benützte ich die Menge der von ihr aus den Fetten bzw. Estern freigemachten Fettsäuren. Diese bestimmte ich durch Titration mit $^n/_{10}$-Kalilauge unter Anwendung von 1 proz., äthylalkoholischer Phenolphthaleinlösung als Indikator.

Zuerst arbeitete ich mit 0,5—1 proz. Öl- oder Trioleinemulsionen. Da diese jedoch bald wieder aufrahmten und damit die Angriffsfläche für die Lipase erheblich reduzierten, verwendete ich in der Folge die in Wasser löslichen Glyceride: Monobutyrin und Triacetin. Außer ihrer Löslichkeit haben die beiden Ester den Vorteil, daß sie eine erheblich größere Verseifungszahl aufweisen als Triolein, was die Genauigkeit der Methode erhöht. Je nach der Quantität des zugesetzten Esters und der Aktivität der Präparate arbeitete ich mit einer Normalbürette von 50 ccm Inhalt mit Teilung in $^1/_{10}$ ccm oder mit Mikrobüretten, bei denen ein Kubikzentimeter in 100 Teile geteilt war. Über die Genauigkeit der Methode bei Anwendung der verschiedenen Ester gibt folgende Tabelle Auskunft.

Tabelle V.

Fehlergrenzen bei Verwendung verschiedener Ester.

	Triolein	Triacetin	Monobutyrin
Verseifungszahl: 1 g Ester verbraucht zur Verseifung mg KOH	190,4	772,0	343,3
5 ccm 1 proz. Esterlösung (Emuls.) verbraucht z. Verseifung mg $^n/_{10}$-KOH. . .	9,52	38,6	17,3
5 ccm 1 proz. Esterlösung (Emuls.) verbraucht z. Verseifung ccm $^n/_{10}$-KOH . .	1,697	6,879	3,086
1% gespalt. Ester entsprechen ccm $^n/_{10}$-KOH	0,016	0,068	0,0308
Genauigkeit bei Ablesung mit Normalbürette, genaue Ablesung = $^1/_{20}$ ccm	3,1%	0,73%	1,2%
Genauigkeit bei Ablesung mit Mikrobürette, Ablesung möglich bis 0,005 ccm . .	0,31%	0,07%	0,12%

Mit Monobutyrin hat bereits Hanriot (1896) gearbeitet, der die freie Buttersäure mit Na_2CO_3-Lösung titrierte mit Phenolphthalein als Indikator. Rouge (1907, S. 593) ersetzte dann die Na_2CO_3-Lösung durch $Ca(OH)_2$,

dessen Titer nach jeder Versuchsserie mit $^n/_{10}$-Oxalsäure kontrolliert wurde. Zu meinen Versuchen benützte ich eine $^n/_{10}$-Kalilauge, deren Titer mit $^n/_{10}$-HCl in gleicher Weise nachgeprüft wurde. Die Vorratsflasche wurde durch ein Heberrohr mit der Bürette verbunden, deren Luftraum mit demjenigen der Flasche kommunizierte. Letztere war oben durch ein U-Rohr abgeschlossen, das mit KOH durchtränkte Bimssteinstücke enthielt.

Die Lipolyseversuche wurden in sterilisierten, mit Wattepfropf versehenen Erlenmeyerkölbchen ausgeführt. Als Asepticum wurde Toluol verwendet und zwar soviel, daß die Flüssigkeitsoberfläche gerade damit bedeckt war. Durch Versuche wurde festgestellt, daß bei Preßsäften und Extrakten oder befeuchteten Trockenpräparaten ein 5 Minuten langes Kochen genügt, um die Lipase abzutöten. Um zu erfahren, wieviel der entstandenen Säuren ausschließlich durch die Lipase gebildet worden war (reine Lipasewirkung), wurde neben jedem Versuch eine Kontrolle verwendet, die sich vom Versuche nur dadurch unterschied, daß in ihr die Lipase durch Kochen zerstört war. Durch Subtraktion der Acidität dieser Kontrollflüssigkeit von der Acidität der aktive Lipase enthaltenden Versuchsflüssigkeit erhielt ich die reine Lipasewirkung. Wenn das Lipasematerial ausreichte, stellte ich stets 2 Parallelversuche an; das Mittel aus beiden Säurebestimmungen beobachtete ich als Maß der Lipasewirkung. Mußte bei höheren Temperaturen gearbeitet werden, so wurden die Wattepfropfen durch gepreßte Korke ersetzt, um ein Entweichen von Ester bzw. freier Säure zu verhindern. Sämtliche Versuche wurden im Dunkeln ausgeführt.

3. Wirkung verschiedener Lipase-Präparate.

a) Lipase in der Nährlösung.

Garnier (1903) und Camus (1897) haben gezeigt, daß Aspergillus niger Lipase in die Nährlösung abscheidet. Camus verwendete die Raulinsche Nährlösung (vgl. Küster); Garnier die von Lutz und Guéguen modifizierte Raulinsche Lösung. Schmidt (1891) hat schon vermutet, daß bei der extracellulären Spaltung von Mandelöl ein Ferment in Frage kommen könnte. Wie seine Analysen zeigen, wird die eine Komponente des Glycerids, nämlich das Glycerin, schneller verarbeitet als die Ölsäure, so daß das aus alten Kulturen zurückgewonnene Fett fast nur noch aus Ölsäure besteht. Die beinahe vollständige Spaltung des Öles in der vorher mit dem Pilz beschickten Nährlösung läßt ohne weiteres auf ein Ektoenzym schließen.

Um die lipolytische Wirkung der Nährlösung zu untersuchen, legte ich in großen, 3litrigen Erlenmeyerkolben Kulturen auf 200 ccm von folgender Nährlösung an:

0,1% K_2HPO_4	0,05% kryst. $MgSO_4$
0,1% NH_4Cl	1,0% Ricinusöl.

Nach halbstündigem Sterilisieren im Dampftopf impfte ich und hielt die Kulturen 21 Tage im dunkeln Thermostaten von 26° C. Nach dieser Zeit waren die Öltropfen ganz von Mycel eingehüllt, das inzwischen reichlich Sporen gebildet hatte. Die Nährlösung war schwach braungelb verfärbt, jedoch konnte an 20 ccm derselben der Farbenumschlag bei der Titration noch gut erkannt werden. Nach Prüfung mit Ölimmersion auf absolute Reinheit wurde die Nährlösung zweier Kolben durch dichte Schleichersche Filter filtriert, die eine Hälfte mit K_2CO_3 gegen Lackmus schwach alkalisch gemacht, die andere Hälfte nicht neutralisiert. Sie reagierte gegen Lackmus sauer. Die Wirkung gleicher Mengen beider Proben auf 5 ccm Trioleinemulsion bei gleichen äußeren Bedingungen ist aus Tabelle VI ersichtlich.

Tabelle VI.

Wirkung eines Kulturfiltrates auf Triolein.

Versuchsdauer 54 Stunden, Temp. 38°. 4 Tropfen Phenolphth.

Schwach-alkal. Kulturfiltrat		Saures Kulturfiltrat	
20 ccm nicht-gekocht. Filt.	0,25 ccm $^n/_{10}$-KOH	20 ccm nicht-gekocht. Filt.	8,70 ccm $^n/_{10}$-KOH
20 ccm gekochtes Filtrat. .	0,25 ccm $^n/_{10}$-KOH	20 ccm gekochtes Filtrat. .	7,50 ccm $^n/_{10}$-KOH
Wirkung . . .	0,0 ccm $^n/_{10}$-KOH	Wirkung . . .	1,20 ccm $^n/_{10}$-KOH
„ i. %:	0.	„ i. %:	75.

Der Versuch zeigt deutlich, daß die Nährlösung lipolytisch wirkt und daß es sich um eine Phytolipase handelt, die Glyceride höherer Fettsäuren, z. B. Triolein, kräftig zu spalten vermag. Ferner sehen wir, daß bei gegen Lackmus alkalischer Reaktion die Lipasewirkung gehemmt wird, während sie bei saurer Reaktion eintritt.

In einem weiteren Versuche wurde mit sonst gleicher Nährlösung Pepton als N-Quelle benützt (0,5 proz.).

Die Kulturen wurden 20 Tage in der Dunkelkammer bei 20° C gehalten. In dieser Zeit bildete sich eine mäßig dicke, noch nicht kompakte Myceldecke, die starke Sporenbildung aufwies. Die Nährlösung war von weingelber Färbung, vollkommen klar und bakterienfrei; ich neutralisierte sie nach Filtration mit K_2CO_3 gegen Lackmus und stellte mit ihr folgenden Versuch an:

Tabelle VII.

Wirkung eines Kulturfiltrates auf Triolein.

Zeit: 41 Stunden, Temp.: 21° C.

10 ccm	Filtrat	+ 10 ccm	1 proz.	Trioleinemulsion:	0,35 ccm	$^n/_{10}$-KOH
20 „	„	+ 10 „	„	„	0,70 „	„
30 „	„	+ 10 „	„	„	1,00 „	„

Die Nährlösung erweist sich somit als lipaseaktiv. Zugleich zeigen die erhaltenen Resultate eine deutliche Abhängigkeit der Fettspaltung von der Filtratmenge.

Aus dem Mycel wurde nach Ausätherung ein Extrakt nach Rouge (1907, S. 594) bereitet und dieser ebenfalls mit K_2CO_3 gegen Lackmus neutralisiert. 2,5 ccm dieses Extraktes machen in 24 Stunden bei 21° C aus 5 ccm 1 proz. Trioleinemulsion 12,5% Ölsäure frei. Leider reichte der Extrakt zu vergleichenden Versuchen mit der lipasehaltigen Nährlösung nicht mehr aus. Der Mycelrückstand wurde bei 22° C getrocknet und nachher gut zerrieben.

2 g desselben setzten in 25 Stunden bei 21° C aus 10 ccm 1 proz. Trioleinemulsion 4,5% Ölsäure in Freiheit. Diese schwache Wirkung ist wahrscheinlich auf die unvollkommene Auspressung des mit Sand zerriebenen Mycels zurückzuführen und spricht wie die relativ starke Wirkung des Mycelextraktes zugunsten der Wasserlöslichkeit der Lipase.

Ein letzter Versuch wird zeigen, daß auch auf einem von Fett freien Substrat Lipase gebildet wird.

In Grangerkolben wurden je 100 ccm folgender Nährlösung abgefüllt:

0,1% KH_2PO_4
0,05% $MgSO_4$ kryst.
0,5% Pepton
1,0% Rohrzucker.

An 3 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Kulturgefäße je 20 Min. lang sterilisiert. Nach Beimpfung verblieben die Kulturen 10 Tage bei 20° C im Dunkelzimmer. In dieser Zeit bildeten sich dicke Decken, die einen kräftigen Sporenbelag aufwiesen. Die Kulturflüssigkeit wurde abfiltriert und gegen Lackmus neutralisiert; sie war so intensiv braungelb verfärbt, daß beim Titrieren nur 10 ccm den Farbenumschlag noch deutlich erkennen ließen. 10 ccm Kulturflüssigkeit verursachten in einer 0,5 proz. Olivenölemulsion eine Spaltung von 37,5% (Zeit: 24 Stunden, Temp.: 36°, Mikrobürette).

Es wird somit auch Lipase in eine Nährlösung ausgeschieden, die kein Fett enthält.

Ich versuchte durch Eintragen der Nährlösung in das 5- bis 6fache Volumen von 96proz. Alkohol die Lipase auszufällen; die gebildeten Niederschlagsmengen waren jedoch äußerst gering und bestanden wohl zum größten Teil aus Pepton.

b) Lipase in Extrakten.

Es wurde bereits oben gezeigt, daß ein nach der Methode von Rouge hergestellter Glycerinextrakt ein wirksames Präparat liefert, doch gibt auch ein Wasserextrakt ein positives Resultat.

Die zum Extrakt verwendeten Kulturen wurden 14 Tage bei 27° C auf folgender Nährlösung gezüchtet:

0,1 KH_2PO_4
0,1 $NH_4 \cdot Cl$
0,05 $MgSO_4$ kryst.
1,0 Haselnußöl.

Die dicht mit Sporen bedeckten, relativ dünnen Decken wurden nach Entfettung durch Äther mit gereinigtem Quarzsand und einigen Tropfen $^n/_{10}$-Essigsäure so lange zerrieben, bis eine Probe unter dem Mikroskop keine intakten Zellen mehr erkennen ließ. Dann wurde das 10fache Volumen dest. Wassers zugesetzt, das Ganze durch ein Schleichersches Filter filtriert und das Filtrat mit Na_2CO_3 gegen Lackmus neutralisiert.

Tabelle VIII.

Wirkung verschiedener Extraktmengen bei konstantem Volumen auf 5 ccm 1 proz. Monobutyrin bei 40°.

Versuchsdauer: 22 Stunden.

ccm Extrakt ccm H_2O	1 4	2 3	3 2	4 1	5 0
Wirkung in ccm $^n/_{10}$-KOH	0	0,4	0,8	1,1	1,45
„ „ „ in %	0	13,3	26,6	36,6	48,3

Der wässerige Auszug aus Aspergillus niger enthält also Lipase. Die Essigsäure wurde darum zugegeben, weil sich eine ganz schwach saure Reaktion als für die lipolytische Wirkung günstig erwies.

c) Wirkung eines Preßsaftes.

Um eine möglichst große Mycelmenge zu erhalten, habe ich 27 Grangerkolben mit je 100 ccm der obenerwähnten Nährlösung mit 0,5% Pepton und 1% Rohrzucker beschickt. Nach Beimpfung standen die Kolben bei 32° C 7 Tage lang im Dunkeln. Den Preßsaft stellte ich nach der Methode von Pringsheim (1910, S. 197) dar. Das gewaschene Mycel wurde in einer Handpresse leicht entwässert, dann in einer Reibschale mit Quarzsand und Kieselgur zerrieben, bis eine homogene Masse von Teigkonsistenz resultierte. [Gewichtsverhältnisse wie bei der Preßsaftdarstellung aus Hefe nach Buchner (1903, S. 60).] Die Masse wurde in ein vorher ausgekochtes Preßtuch gegeben und in einer hydraulischen Presse bei 350 Atm. Druck ausgepreßt. Der steril aufgefangene Preßsaft war braunrot und reagierte gegen Lackmus sauer. Er ließ sich durch ein gewöhnliches Filter leicht filtrieren.

Tabelle IX.

Wirkung eines Preßsaftes auf Monobutyrin.

Zeit: 47 Stunden, Temp. 40,5°. 5 ccm 1 proz. Monobutyrin.

ccm Preßsaft	ccm H_2O	Wirkung in ccm	$^n/_{10}$-KOH Wirkung in %
1	4	0,30	10
2	3	0,65	21,6
3	2	0,95	31,6
4	1	1,05	35,0
5	0	1,25	41,6

Der Versuch zeigt also, daß der Preßsaft Lipase enthält, daß aber die Spaltung des Monobutyrins nur anfangs proportional der Enzymmenge ansteigt, nachher aber nicht mehr.

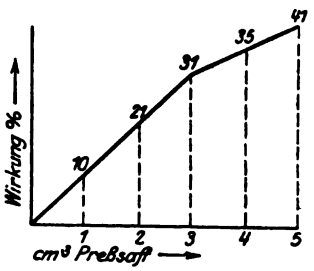


Abb. 1.

In folgendem Versuche wurden 10 ccm Olivenölemulsion zur Stabilisierung der Emulsion mit einer Spur Gummi arabicum versetzt und die Wirkung des Preßsaftes auf Olivenöl untersucht.

Tabelle X.

Wirkung eines Preßsaftes auf Olivenölemulsion.

Zeit: 45 Stunden, Temp.: 40,5°.

10 ccm ungekochter Preßsaft verbr. $^n/_{10}$-KOH in ccm: 4,70, gesp. Öl: 59,8%
10 „ gekochter „ „ „ „ „ 2,90, „ „ 0%

Der Preßsaft besitzt somit die Fähigkeit, auch Olivenöl intensiv zu spalten.

d) Ausfällung der Lipase aus einem Preßsaft.

Um die Lipase aus einem Preßsaft ausfällen zu können, habe ich 20, 6 Tage alte, bei 34° C gewachsene Kulturen von Grangerkolben mit 100 ccm Nährlösung (enthaltend Rohrzucker und Pepton) ausgepreßt.

Der Preßsaft, der genau gleich aussah wie beim vorherigen Versuche, wurde durch Glaswolle filtriert und hierauf in das 6fache Volumen 95 proz. Alkohol gegossen. Es bildete sich ein grauweißer Niederschlag, der nach kurzem Absitzenlassen rasch filtriert und bei 40° getrocknet wurde. Der trockene Rückstand wurde vom Filter abgehoben und fein zerrieben. Von diesem Pulver spalteten 0,05 g in 23 Stunden bei 40° C aus 5 ccm 1 proz. Monobutyrin 16,6% Buttersäure ab. Mit 0,05 g Pulver, 1 g Triolein und

0,6 ccm Wasser wurde eine Emulsion hergestellt, wie sie von Yalander (1911) bei seinen Studien über die Ricinuslipase verwendet wurde. Das Gemisch blieb 48 Stunden bei 33° C stehen.

Leider vergaß ich die Proben hie und da zu schütteln, um die Emulsion intakt zu erhalten. Diese war denn auch bei Versuchsabbruch aufgerahmt und es ließ sich deshalb keine starke Lipasewirkung erwarten; tatsächlich wurden in dieser Zeit nur 4% Triolein gespalten.

Der bei 40° C getrocknete Preßrückstand zeigte keine Wirkung.

e) Wirkung von Acetondauerpräparaten.

Bei der Darstellung von Acetondauerpräparaten folgte ich der Methode von Pringsheim (1910, S. 197).

Die Myceldecke einer 14 Tage bei 18° C gewachsenen Pepton-Rohrzuckerkultur wurde ausgewaschen und hierauf in einer Handpresse kräftig entwässert. Der Preßkuchen wurde nun 10 Minuten lang in Aceton geschwenkt, nachdem er vorher fein zerkleinert worden war. Nach dem Absitzen der aufgeschwemmten Masse wurde auf der Nutsche möglichst trocken abgesaugt und der wieder zerkleinerte Preßkuchen neuerdings in Aceton eingetragen, wo er während 2 Minuten geschwenkt wurde. Ich habe übrigens festgestellt, daß beim Eintragen in Aceton eine Temperatursteigerung von höchstens 1° C eintritt. Nachdem die Masse grobgepulvert ist, wird sie in einer Schale mit Äther übergossen; sie bleibt 3 Minuten darin und wird öfter umgerührt. Nach dem Absaugen des Äthers wird die gepulverte Masse auf Filtrierpapier $^1/_2$—1 Stunde an der Luft liegengelassen. Nachher trocknet man im Thermostaten bei 40—45°. Die Ausbeute betrug in diesem Falle 0,5 g. Mit diesem Präparat wurde die Wirkung auf Triacetin untersucht.

Tabelle XI.

Wirkung eines Acetonpräparates auf Triacetin.

5 ccm 2,5 proz. Triacetin. Dauer: 24 Stunden, Temp.: 41° C

Pulver g	Wirkung ccm $n/_{10}$-KOH	Wirkung mgr KOH	%-Triacetin gespalten
0,1	3,70	20,75	21,6
0,2	4,68	26,25	27,5

Dieser Versuch zeigt deutlich, daß das Acetonpräparat Lipase enthält.

4. Abhängigkeit der Lipasebildung von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle.

Aus den Arbeiten zahlreicher Forscher (Katz 1898, Butkewitsch 1902, Grezes 1912, Knudson 1913, Kylin 1914) geht hervor, daß der Nährboden die Bildung der Enzyme so weit

beeinflussen kann, daß sie in verschiedener Menge oder überhaupt nicht gebildet werden. So hat Kylin festgestellt, daß die Diastasebildung von Aspergillus niger bei Zugabe von Stärke gesteigert wird und bei ausschließlicher Kultur auf Stärke einen maximalen Wert erreicht.

Um die Einwirkung des Nährbodens auf die Lipasebildung festzustellen, habe ich Kulturen in Grangerkolben auf 100 ccm folgender Nährlösung angesetzt:

0,1% KH_2PO_4
0,1% NH_4Cl resp. äquival. Menge Pepton
0,05% $MgSO_4$ kryst.
1,0% C-Quelle
100 ccm Aqua dest.

Von diesen Kulturen wurden Acetondauerpräparate hergestellt und die Wirkung gleicher Gewichtsmengen des Präparates auf eine gleiche Estermenge unter gleichen Versuchsbedingungen untersucht. Kulturdauer 9 Tage, Temp. 35° C.

Tabelle XII.

Einfluß verschiedener C- und N-Quellen auf die Lipasebildung.

0,1 g Acetondauerpräparat, 5 ccm 1 proz. Monobutyrin. Zeit: 24 Stunden, Temp.: 38° C.

Substrat	Wirkung in %
Haselnußöl	98,3
H.-Öl + Pepton (16% N) . . .	90,0
Rohrzucker + Pepton	33,3

Hier fällt sofort der große Unterschied zwischen der Lipasebildung auf Öl als einziger organischer C-Quelle und einer Nährlösung mit Pepton als N-Quelle und Rohrzucker als C-Quelle auf. Im ersten Falle ist die relative Lipasemenge 3 mal größer als im letzten. Die Lipasebildung der Pepton-Ölkultur steht dagegen nur wenig hinter derjenigen der Ölkultur zurück.

Der folgende Versuch befaßte sich mit der Lipasebildung auf Triolein und seinen Komponenten. Die Kulturdauer betrug 11 Tage, Temp. 35° C.

Tabelle XIII.

Lipasebildung auf verschiedenen C-Quellen.

0,2 g Pulver, 5 ccm 1 proz. Monobutyrin. Zeit: 24 Stunden, Temp.: 38° C.

Substrat	Spaltung in %
Triolein	98,3
Ölsäure	90,0
Glycerin	40,0

Aus Tabelle XIII geht hervor, daß die C-Quelle die Lipasebildung quantitativ zu beeinflussen vermag; am meisten Lipase wird auf Triolein gebildet, auf Ölsäure ist die Enzymbildung fast ebenso stark, während sie auf Glycerin um mehr als die Hälfte geringer ist.

Nun sind allerdings diese Resultate nicht ohne weiteres vergleichbar, da wir nach Went (1918, S. 1) auf diese Weise nicht ganz entsprechende Stadien des Pilzwachstums vergleichen, weil ja das Trockengewicht z. B. bei C-Quellen von verschiedenem Nährwert nicht zu gleicher Zeit sein Maximum erreicht. Went zeigte weiter, daß für die Enzymbildung auch ein Zeitoptimum besteht, in welchem diese ihr Maximum erreicht, daß sie später aber wieder sinkt. Da jedoch der Beginn der Mycelentwicklung und derjenige der Sporenbildung unter den angeführten Kulturbedingungen und auf den untersuchten Nährlösungen höchstens um einen Tag differierte, so kann man mit Hilfe der Resultate dieser Versuche den Einfluß des Nährbodens auf die Lipasebildung doch einigermaßen abschätzen. Der genaue Verlauf der Lipasebildung auf den verschiedenen Substraten soll der Gegenstand einer späteren Arbeit sein.

5. Zeitlicher Verlauf der Lipasebildung.

In seiner Untersuchung über den Verlauf der Diastasebildung bei Aspergillus niger hat Went (1918) gezeigt, daß in einer Nährlösung mit 0,5% Glucose, 0,5% $NH_4 \cdot NO_3$, 0,1% K_2HPO_4 und 0,05% $MgSO_4$ bei 35° C die Diastasebildung sofort rasch ansteigt, nach etwa 5 Tagen ein Maximum erreicht und dann ebenso rasch wieder abnimmt. Das Trockengewicht dagegen erreicht das Maximum erst nach 9 Tagen.

Folgender Versuch zeigt nun, daß auch bei der Lipasebildung ähnliche Verhältnisse bestehen.

Der Pilz wurde in Grangerkolben bei 33—34° C auf 100 ccm Nährlösung folgender Zusammensetzung kultiviert:

0,1% KH_2PO_4
0,05% $MgSO_4$
0,5% Pepton
1,0% Rohrzucker.

Die im folgenden für das Trockengewicht angegebenen Zahlen sind immer das Mittel aus 2 Bestimmungen. Um diese auszuführen, hob ich die Myceldecken möglichst ohne Verlust ab, wusch sie gut aus und trocknete

nachher in tarierten Wägläschen bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz, was etwa 6 Stunden beanspruchte, und wog dann. Zur Bestimmung des Lipasegehaltes der Nährlösung wurde diese filtriert und mit K_2CO_3 gegen Lackmus neutralisiert. Die durch die Verdunstung eingetretene Volumabnahme glich ich durch Zugabe von destilliertem Wasser aus. Von den Mycelien wurden gleiche Gewichtsmengen eines Acetonpräparates verglichen.

a) Verlauf der Bildung des Trockengewichtes.

Tabelle XIV.

Verlauf der Bildung des Trockengewichtes.

Alter der Kultur Tage	Trockengewicht in g
2	0,135
4	0,301
6	0,515
8	0,490
10	0,440

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß das Trockengewicht nach einer Kulturdauer von 6 Tagen sein Maximum erreicht.

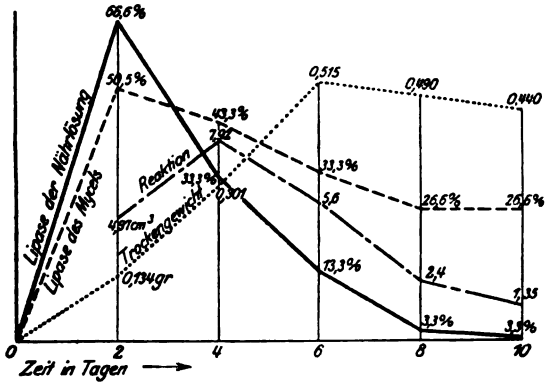


Abb. 2.

b) Verlauf der Acidität in der Nährlösung.

Die Resultate der Versuche über den zeitlichen Verlauf der Lipasebildung sind in Abb. 2 graphisch dargestellt. Diese enthält noch eine Kurve, die den Reaktionsverlauf in der Nährlösung während der Versuchsdauer zeigt.

Von 2 verschiedenen Kulturen wurden je 20 ccm der filtrierten Nährlösung genau abpipettiert, mit 3 Tropfen Phenolphthalein versetzt und unter Anwendung von $^n/_{10}$-KOH titriert. Die Werte, nach denen die Kurve konstruiert ist, sind immer das Mittel aus 2 solchen Bestimmungen.

Tabelle XV.

Verlauf der Reaktion.

Alter der Kultur Tage	Verbrauch an $^n/_{10}$-KOH in ccm
2	4,87
4	7,92
6	5,60
8	2,40
10	1,35

Die in Kolonne 2 von Tabelle XV enthaltenen Zahlen repräsentieren keine eigentlichen Aciditätsbestimmungen, sondern nur Bestimmungen der freien Wasserstoffionen, wobei noch zu berücksichtigen ist, daß eventuell vorhandene, kolloid gelöste Stoffe, für die ja eine enorme Oberflächenentwicklung charakteristisch ist, die Kalilauge durch Adsorption festhalten können. Zudem ist ja in der Nährlösung Pepton vorhanden, das in seiner Eigenschaft als amphoterer Elektrolyt sowohl Säuren als auch Basen binden kann. Trotzdem schien mir eine Bestimmung des Reaktionsverlaufes angezeigt, weil wir durch sie in den Stand gesetzt werden, die Reaktionsverhältnisse zu überblicken, unter denen das Enzym während der Versuchsdauer steht.

c) Verlauf der Enzymbildung.

Enzymabscheidung in die Nährlösung.

Verwendet wurden 30 ccm der Kulturflüssigkeit, deren Volumen ich durch Zusatz von destilliertem Wasser stets auf 100 ccm hielt und dadurch den Verdunstungsverlust ausglich.

Zeit: 24 Stunden, Temp.: 40° C, 3 Tropfen Phenolphthalein.

Tabelle XVI.

α) Lipasebestimmungen in der Nährlösung.

Alter der Kultur Tage	Wirkung in % Mittel aus 2 Kulturen
2	94,0
4	33,3
6	16,6
8	3,3
10	0

Wie Tabelle XVI zeigt, erreicht der Lipasegehalt der Nährlösung schon nach 2 Tagen sein Maximum, fällt dann aber rasch und erreicht nach 10 Tagen den Wert Null.

β) Enzymbildung im Mycel.

0,1 g Acetondauerpräparat aus Material von 4 Kolben nach möglichst feiner Pulverisierung, 5 ccm 1 proz. Monobutyrin, Zeit: 24 Stunden, Temp.: 40° C.

Tabelle XVII.

Lipasegehalt des Mycels.

Alter der Kultur Tage	Wirkung in % Mittel aus 2 Bestimmungen
2	50,0
4	43,3
6	33,2
8	26,6
10	26,6

Also auch hier wird das Maximum der Lipasebildung schon am 2. Tage erreicht. Allerdings sinkt von diesem Zeitpunkt an der Gehalt nicht so rasch wie in der Nährlösung. Es liegen somit hier ähnliche Verhältnisse vor wie bei der von Went studierten Diastasebildung. Auch für die Lipase fallen die Maxima des Trockengewichtes und der Enzymbildung nicht zusammen, indem zuerst nach 2 Tagen die Enzymbildung das Maximum erreicht und das Trockengewicht erst nach 6 Tagen maximal wird. Der Lipasebildung im Mycel entspricht auch der Lipasegehalt der Nährlösung, es handelt sich also um ein Ektoenzym.

Die nach Erreichung des Maximums erfolgende Abnahme des Enzymgehaltes ist schwierig zu erklären. Went hält eine später eintretende Zerstörung des Enzyms für möglich.

Die oben angeführten Versuche erstrecken sich auf die Dauer von 10 Tagen. Es erhebt sich nun die Frage, wie sich der weitere Verlauf der Kurve gestaltet. Dieser wird wohl durch die Bildung von neuem Mycel stark beeinflußt, das durch Auskeimung der in der Kultur gebildeten Sporen entsteht. Dieser Vorgang wird sich in allerdings stets abnehmendem Maße immer wiederholen. Die Kurven, die alle mehr oder weniger vollkommene Horizontalrichtung angenommen haben, erleiden dadurch so lange kleine Ausschläge nach oben, bis für die Sporenkeimung keine günstigen Bedingungen mehr existieren. Diese Verhältnisse hat Went (1918) bei der Diastasebildung durch Aspergillus niger eingehend studiert und den Verlauf der Enzymbildung während 149 Tagen quantitativ verfolgt.

Spätere Versuche müssen zeigen, wie sich der Verlauf der Lipasebildung noch auf anderen Substraten gestaltet und von welchen Faktoren die Lage der verschiedenen Maxima abhängt.

III. Abhängigkeit der Lipasewirkung von äußern Faktoren.

1. Einfluß der Temperatur.

a) Hohe Temperaturen.

Zu den Versuchen über die Abhängigkeit der Lipasewirkung von äußeren Faktoren wurde Material verwendet, das aus Rohrzucker-Peptonkulturen stammt, welche 7 Tage bei 34° C gehalten worden waren.

Um den Einfluß hoher Temperaturen bzw. trockener und feuchter Hitze festzustellen, ließ ich solche in verschiedener Dauer auf das Enzym wirken.

Tabelle XVIII.

Wirkung trockener und feuchter Wärme.

Wirkungsdauer des Enzyms: 48 Stunden, Temp.: 31—32° C, 10 ccm 1 proz. Triacetin, 0,1 g Pulver.

Vorbehandlung	Wirkung in mg KOH
Keine Vorbehandlung	6,73
1 Stde. im Trockenschrank bei 100° erhitzt	3,59
2 Stdn. im Trockenschrank bei 100° erhitzt	1,96
5 Min. im Dampftopf (97°) erhitzt	0

Tabelle XVIII zeigt, daß ein 1stündiges Erhitzen die Wirkung des Präparates nicht ganz aufhebt, sondern nur etwa auf die Hälfte reduziert; eine 2stündige, gleichstarke Erwärmung setzt die Wirkung etwa auf ein Drittel herab. Das 5 Minuten lange Erhitzen im Dampfstrome hat dagegen eine vollständige Aufhebung der Aktivität zur Folge.

b) Mittlere Temperaturen.

0,2 g Pulver, 5 ccm 1 proz. Monobutyrin, Versuchsdauer 25 Stunden.

Tabelle XIX.

Einfluß mittlerer Temperaturen.

Temperatur °C	Verbrauch an mg KOH	%-Monobutyrin gespalten
20	6,40	36,6
30	7,29	43,3
40	12,06	71,6
50	10,09	60,0

Wir sehen aus diesem Versuche, daß bei 40° C die stärkste Esterspaltung eintritt.

Im folgenden Versuch mit neutralem Preßsaft einer gleichaltrigen Kultur wurde hauptsächlich die Wirkung der Temperaturen in der Nähe von 40° C untersucht.

Tabelle XX.

Wirkung der Temperaturen um 40° C.

Temperatur °C	%-Ester gespalten
21,5	13,3
35,0	20,0
40,0	23,3
44,5	13,3
52,0	6,6

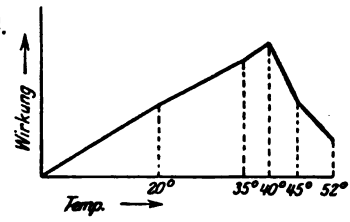


Abb. 8.

Beide Versuche zeigen, daß die Wirkung bis zu 40° C ansteigt und bei höherer Temperatur wieder abzunehmen beginnt. Rouge (1907, S. 660) stellte fest, daß die Lipase von Lactarius sanguifluus (Fres.) bei einer Temperatur von 45° C am stärksten wirkt, während die Optimaltemperatur für das Wachstum des Pilzes bei 25° C liegt; zwischen beiden Optima befindet sich somit das beträchtliche Intervall von 20° C.

Salmenlinna (1917), der die Entwicklung der Rasse β von Aspergillus niger bei verschiedenen Temperaturen studierte, fand, daß das ökologische Optimum, d. h. diejenige Temperatur, bei welcher unter gleichzeitig intensiver Sporenbildung das größte Trockengewicht in kürzester Zeit gebildet wird, bei 35—37° C liegt. Eigene Versuche, bei denen ich den Durchmesser der Kolonien auf Agarplatten, sowie die Sporenbildung als Kriterien für die Intensität des Wachstums benützte, ergaben, daß dieses bei 35° C am stärksten ist. Somit liegen bei Aspergillus niger die Optima für das Wachstum und für die Lipasewirkung nur 3—5° C auseinander, also lange nicht so weit auseinander wie bei Lactarius sanguifluus.

2. Einfluß der Enzymmenge.

Der Einfluß der Enzymmenge auf die Lipolyse wurde dadurch festgestellt, daß bei gleicher Estermenge und gleichen Versuchsbedingungen verschiedene Enzymmengen zur Wirkung kamen. 5 ccm 2,5proz. Triacetin, Zeit 49 Stunden, Temp. 38° C.

Tabelle XXI.

Einfluß der Enzymmenge.

Pulvermenge g	Relative Enzymkonzentration	Verbrauch mg	KOH-Spaltung in %
0,05	1	15,14	15,8
0,10	2	24,12	25,2
0,20	4	30,29	31,7
0,30	6	40,39	42,3
0,40	8	44,88	47,0
0,50	10	49,36	51,7

Diese Versuchsserie zeigt, daß mit zunehmender Enzymkonzentration auch die Spaltung zunimmt. Doch besteht zwischen diesen beiden Größen keine Proportionalität.

Nach Schütz (1885) verläuft die Enzymwirkung proportional der Quadratwurzel aus der Enzymmenge. Die Formel für diesen Verlauf lautet: $U = x \cdot \sqrt[2]{E}$, wo U den Umsatz, E die Enzymmenge und x in diesem Beispiele die Estermenge bedeutet, die durch die Konzentration 1 des Enzyms gespalten wird. Die Konstante x hat hier den Wert 15,8.

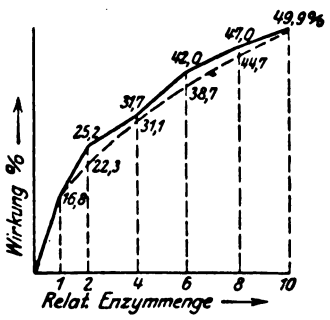


Abb. 4.

In Abb. 4 verbindet die obere Kurve die tatsächlich gefundenen Werte, während die untere die nach der Schützschen Regel berechneten darstellt. Die Abbildung zeigt, daß zwischen den theoretischen und den praktisch gefundenen Werten eine gute Übereinstimmung besteht.

8. Einfluß des Substrates.

a) Qualität des Substrates.

Durch einen früheren Versuch (S. 18) habe ich gezeigt, daß Aspergillus niger auf Triolein, Tripalmitin und Triacetin Wachstum zeigt, auf Monobutyrin und den Äthylestern der Butter-, Bernstein- und Benzoesäure dagegen nicht gedeiht.

Der folgende Versuch soll nun die Wirkung der von Aspergillus gebildeten Lipase auf verschiedene Ester zeigen und gleichzeitig feststellen, ob der Pilz auf oben genannten Stoffen darum nicht gedeiht, weil seine Lipase diese nicht zu hydrolysieren vermag.

Tabelle XXII.

Wirkung auf verschiedene Ester.

0,1 g Pulver, 10 ccm 1 proz. Ester. Versuchsdauer: 48 Stunden, Temp.: 39° C.

Ester	Spaltung in %
Monobutyrin . .	45,1
Triacetin	28,5
Benzoesaur. Äthyl	0
Buttersaur. Äthyl	6

Tabelle XXII zeigt die gute Wirkung der Lipase auf Monobutyrin und Triacetin, während der Buttersäureäthylester nur schwach und das benzoesäure Äthyl überhaupt nicht gespalten wurde. Die Wirkung auf malonsaures bzw. bernsteinsaures Äthyl war in einem ähnlichen Versuche undeutlich. Außerdem wurde festgestellt, daß 0,05 g dieses Pulvers von 1 g Ricinusöl in 46½ Stunden bei 39° C 9% spalteten. Diese geringe Wirkung muß wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, daß sich die Emulsion nicht lange hielt. Die Versuche zeigen, daß wir es bei Aspergillus niger mit einer echten Lipase zu tun haben, die hauptsächlich die Glyceride der Fettsäuren intensiv zu spalten vermag. Da der Pilz auf Glycerin gut gedeiht, ist wohl die Buttersäure für die Wachstumshemmung verantwortlich zu machen.

b) Quantität des Substrates.

Der Einfluß der Substratmenge auf den Verlauf der Esterspaltung kann dadurch klargestellt werden, daß gleichen Enzymmengen unter sonst gleichen Versuchsbedingungen verschiedene Estermengen geboten werden. Folgender Versuch gibt darüber näheren Aufschluß.

Tabelle XXIII.

Einfluß der Substratmenge.

0,1 g Pulver, Zeit: 44 Stunden, Temp.: 40° C, 1% Monobutyrin, konstantes Volumen: 10 ccm.

Relat. Estermenge	KOH-Verbrauch in mg	Spaltung in %
2	4,48	66,6
4	5,61	41,6
6	6,73	32,7
8	7,57	27,6
10	8,13	21,9

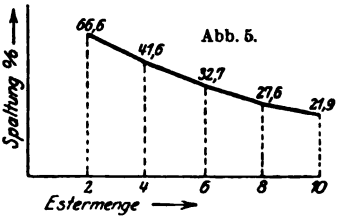


Abb. 5.

Diese Versuchsreihe zeigt, daß die Spaltung nicht proportional der Konzentration des Esters erfolgt, daß also der relative Umsatz um so größer ist, je niedriger die Konzentration des Esters, und umgekehrt.

4. Einfluß der Spaltprodukte.

Beim Studium des Einflusses der Spaltprodukte auf die Enzymtätigkeit untersuchte ich zuerst die Wirkung verschiedener Glycerinkonzentrationen.

Dabei wandte ich 0,1 g Enzympulver und 5 ccm 1 proz. Monobutyrin an. Durch Zugabe von destilliertem Wasser hielt ich das Volumen konstant bei 15 ccm. Versuchsdauer: 24 Stunden, Temp.: 40° C.

Tabelle XXIV.

Wirkung des Glycerins.

Glycerinmenge		Gespaltenes Monobutyrin
in ccm	in Vol.-Proz.	
0	0	30,2
2	13,3	25,0
4	26,6	22,3
6	40,0	19,7

Wir können dieser Versuchsreihe entnehmen, daß ein Zusatz von 13,3 vol.-proz. Glycerin auf die Esterspaltung bereits hemmend wirkt und daß die hemmende Wirkung mit zunehmender Glycerinkonzentration zunimmt. Wenn wir aber mit so geringen Estermengen arbeiten, wie dies in meinen Versuchen der Fall ist, so wird das bei der Fettspaltung freiwerdende Glycerin die Tätigkeit des Enzyms kaum zu beeinflussen vermögen.

Von den Säuren wurde die Essigsäure hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Verlauf der Esterspaltung untersucht.

Ich ließ dabei 0,2 g Enzympulver auf eine Lösung von 1 proz. Triacetin in destilliertem Wasser oder in $^n/_{10}$-, $^n/_{100}$- und $^n/_{1000}$-Essigsäure als Substrat einwirken. Versuchsdauer: $44^1/_4$ Stunden, Temp.: 34° C (Mikrobürette).

Tabelle XXV.

Wirkung verschiedener Essigsäuremengen.

1% Triacetin in 10 ccm	Esterspaltung in %
H_2O	11,5
$^n/_{1000}$-Essigsäure .	11,5
$^n/_{100}$-Essigsäure . .	10,7
$^n/_{10}$-Essigsäure . .	8,4

Tabelle XXV zeigt, daß in einer $^n/_{10}$-Essigsäure die Spaltung deutlich gehemmt wird, während sie in einer $^n/_{100}$- bzw. $^n/_{1000}$-Essigsäure von derjenigen in Wasser nur schwach oder gar nicht abweicht.

In derselben Weise untersuchte ich auch die Wirkung der Oxalsäure und zwar hauptsächlich deshalb, weil diese ja von Aspergillus niger selbst gebildet wird.

Tabelle XXVI.

Wirkung verschiedener Oxalsäuremengen.

1 % Monobutyrin in 5 ccm	Esterspaltung in %
H_2O	50,0
$^n/_{1000}$-Oxalsäure . .	30,0
$^n/_{100}$-Oxalsäure . .	26,6
$^n/_{10}$-Oxalsäure . .	5,0

Die Resultate dieser Versuchsreihe sind leicht verständlich, wenn man den Dissoziationsgrad der beiden verwendeten Säuren miteinander vergleicht. Nach Treadwell (1914, S. 13) ist die $^n/_{10}$-Oxalsäure zu 60% dissoziiert, die $^n/_{10}$-Essigsäure dagegen bloß zu 1,3%. Die viel stärker hemmende Wirkung höherer Oxalsäurekonzentrationen beruht also offenbar auf ihrem höheren Dissoziationsgrad.

5. Zeitl. Verlauf der Esterspaltung.

Um einen Einblick in den zeitlichen Verlauf der Esterspaltung zu gewinnen, setzte ich gleichzeitig zahlreiche Versuchsgemische unter genau denselben Bedingungen an und hielt sie während der Versuchsdauer unter genau gleichen äußeren Bedingungen.

Tabelle XXVII.

Zeitlicher Verlauf der Esterolyse.

0,2 g Pulver, 5 ccm 1 proz. Monobutyrin. Temp.: 39° C.

Zeit in Std.	Spaltung in %
1	10,0
2	15,0
3	18,3
4	—
5	23,3

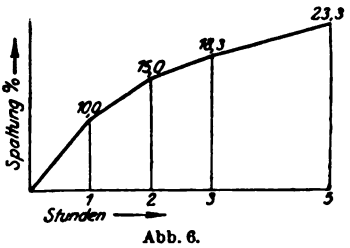


Abb. 6.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Esterspaltung bis zur 5. resp. 8. Stunde stetig ansteigt. Immerhin besteht kein Parallelismus zwischen Zeit und Enzymwirkung. Die Kurve nähert sich bald der Horizontalen, was zeigt, daß die Reaktion einem Gleichgewichtszustande zustrebt.

Ein weiterer, sich auf 8 Tage erstreckender Versuch lieferte dasselbe Kurvenbild.

Schlußbetrachtungen.

Der von mir untersuchte Stamm von Aspergillus niger hat die Fähigkeit, die Fette, welche in der freien Natur in den verschiedensten Substraten enthalten sind, auf enzymatischem Wege zu hydrolysieren und dadurch einen weiteren Abbau dieser Stoffe zu ermöglichen. Seine Lipasebildung befähigt ihn, auf organischen Medien mit Fetten als einziger organischer C-Quelle zu gedeihen und aus diesen seinen C-Bedarf zu decken. Da seine Temperaturkurven für Wachstum und Lipasebildung nahezu parallel verlaufen und dementsprechend auch die Temperaturoptima für beide Vorgänge nahe beisammen liegen, vermag Aspergillus niger gerade bei bestem Wachstum die Fette am besten zu spalten.

Bei Wachstum und Lipasewirkung von Aspergillus niger spielt die Reaktion des Substrates eine wichtige Rolle. Der untersuchte Pilz gehört bekanntlich zu denjenigen Organismen, die bei saurer Reaktion des Mediums bedeutend besser gedeihen als bei alkalischer. Meine Versuche haben nun ergeben, daß die Aspergilluslipase bei gegen Lackmus neutraler Reaktion bzw. schwach saurer Reaktion am stärksten wirkt, während sie bei alkalischer und stark saurer Reaktion in ihrer Wirkung bedeutend gehemmt wird. Vielleicht fallen auch hier die optimalen Bedingungen für Wachstum und Lipasewirkung zusammen, doch können darüber nur genaue Bestimmungen der für das Wachstum und Lipasewirkung optimalen Wasserstoffionenkonzentrationen Aufschluß geben, die ich nicht ausgeführt habe.

Aspergillus niger bildet auf zahlreichen, wesentlich verschiedenen Substraten Lipase, offenbar ganz allgemein dann, wenn die Bedingungen für den Pilz günstig sind. Eine bedeutende Steigerung der Enzymbildung tritt aber ein, sobald ein Medium Fette enthält, also diejenigen Stoffe, welche vom Enzym

gespalten werden. Somit liegt bei Aspergillus niger nach Kylins (1914, S. 499) Ausdrucksweise quantitative Enzymregulation vor. Eine solche ist für verschiedene andere Enzyme dieses Pilzes schon früher nachgewiesen worden, nämlich durch Katz (1898) und durch Kylin (1914) für die Amylase, durch Grezes (1912) für die Maltase, Invertase, Inulase und das Emulsin.

Auf die Frage nach der Beeinflussung der Enzymbildung durch verschiedene organische Nährstoffe (Kohlenhydrate, Pepton usw.) kann für Aspergillus erst dann eine endgültige Antwort gegeben werden, wenn eine größere Zahl von Versuchen durchgeführt worden ist, wie dies Went (1918) für die Diastase getan hat.

Immerhin scheint aus meinen Versuchen (Tabellen XII, XIII) hervorzugehen, daß Rohrzucker, wahrscheinlich auch andere Kohlenhydrate, die Lipasebildung hemmen, während die N-Verbindungen (Pepton oder NH_4Cl) ohne wesentlichen Einfluß sind.

Die hemmende Wirkung von Rohrzucker und wahrscheinlich auch anderer Kohlenhydrate auf die Lipasebildung ist offenbar darauf zurückzuführen, daß die genannten Stoffe vom Pilze ohne Mitwirkung der Lipase direkt resorbiert werden können; eine Herabsetzung der Lipasebildung ist somit biologisch verständlich. Wahrscheinlich ist auch die Abnahme der Lipasebildung bei Zugabe von Glycerin ebenso zu erklären, indem auch hier die Lipasebildung eigentlich überflüssig ist.

Ob die bei der Spaltung der Fette entstehenden Fettsäuren, die ja dem Pilz auch als Nährstoffe dienen können, die Enzymbildung aus dem gleichen Grunde hemmen, kann vorläufig nicht entschieden werden, weil der Einfluß der Fettsäuren auf die Lipasebildung nicht eingehend untersucht worden ist.

Ebenso bleibt noch zu untersuchen, ob der die Enzymwirkung hemmende Einfluß der Fettsäuren nur auf der Wasserstoffionenkonzentration beruht, oder ob auch das Anion hemmend wirkt.

Die mit der Fettspaltung von Aspergillus niger stets verbundene Bildung von Oxalsäure steht mit der Lipasebildung in keinem engeren Zusammenhang, da dieser Pilz auch bei fettfreier Ernährung Oxalsäure bildet.

Zusammenfassung.

1. Der untersuchte Stamm von Aspergillus niger (Rasse β-Brenner) ist zur Fettspaltung befähigt. Er zeigt Wachstum auf Tripalmitin, Tristearin, Triolein; besonders gut gedeiht er auf Triacetin. Kein Wachstum tritt dagegen ein auf den Äthylestern der Buttersäure, der Malonsäure, der Bernsteinsäure und der Benzoesäure.

2. Auf Olivenöl, Ölsäure und Glycerin wird wie auf Rohrzucker Oxalsäure gebildet.

3. Die Fettspaltung wird durch eine in die Nährlösung abgeschiedene Lipase, somit durch ein Ektoenzym bewirkt, das jedoch auch in einem Wasserextrakt, in einem Glycerinextrakt (nach Rouge), im Preßsaft und in einem Acetondauerpräparat in wirksamer Form aus dem Mycel gewonnen werden kann. Aus einem Preßsafte konnte das Ferment mit Alkohol ausgefällt werden.

4. Auf fetthaltigen Medien wird am meisten Lipase gebildet, bedeutend mehr als auf solchen, die Rohrzucker oder Glycerin enthalten.

5. Für die Lipasebildung existiert ein Maximum, das mit dem Trockengewichtsmaximum nicht zusammenfällt, sondern vorher erreicht wird.

6. Das Enzym wird durch feuchte Hitze zerstört.

7. Das Temperaturoptimum für die Spaltung liegt bei 40° C.

8. Die Spaltung geht am besten in einem neutralen bzw. schwach sauren Medium vor sich.

9. Die Spaltung erfolgt bei zunehmender Enzymmenge ziemlich genau nach der Schützschen Regel.

10. Die relative Spaltung sinkt mit zunehmender Fermentkonzentration.

11. Außer verschiedenen Ölen und Fetten spaltet die Lipase auch Monobutyrin und Triacetin. Es liegt also eine echte Lipase vor.

Literatur.

Abderhalden, E., Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. 1910. — Abderhalden und Pringsheim, H., diese Zeitschr. **65**, 180. 1910. — Bayliss, Die Wirkung der Enzyme. 1910. — Biffen, R. H., Annals of Botany **13**, 363. 1899. — Boas, Fr. und Leberle, H., diese

Zeitschr. **90**, 78; **92**, 170. 1918. — Braun, Ber. **36**, 3003. 1900. — Braun und Behrendt, ebenda **36**, 1142. 1900. — Brenner, W., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. II. Abt. **40**, 555. 1914. — Buchner und Hahn, Die Zymasegärung. 1903. — Buller, H. H. R., Annals of Botany **20**, 49. 1906. — Butkewitsch, W., Jahrb. f. wissensch. Botanik **38**. 1902. — Camus, L., Compt. rend. de la soc. de biol. **49**, 192, 193, 230. 1897; **55**, 4. 1903. — Carrière, G., ebenda **53**, 320. 1901. — Connstein, W., Hoyer, E., Wartenberg, H., Ber. **35**, 3988. 1902; Ergebn. d. Physiol. **3**, 194. 1904. — Czapek, Friedr., Biochemie der Pflanzen. 2. Aufl., Bd. I. Fischer, Jena 1913. — Deleano, N. F., diese Zeitschr. **17**, 225. 1909. — Dietz, H., **52**, 279. 1907. — Eijkmann, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. I. Abt. **39**, 841. 1904. — Elfving, Fredr., Oefversigt af Finska Vetenskaps-Societetens Förhandlingar **61**. 1918—1919. Afd. R. Nr. 15. — Garnier, Compt. rend. de la soc. de biol. **55**, 1490, 1583. 1903. — Grezes, G., Ann. de l'inst. Pasteur **26**. 1912. — Hanriot, M., Compt. rend. de la soc. de biol. **53**, 367 u. 369. 1901. — Hanŭs, J. und Stokŷ, A., Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **3**, 606. 1900. — Haselhoff, E. und Mach, F., Landw. Jahrbücher **35**, 445. 1906. — Holderer, M., Thèse Paris 1911; Compt. rend. **155**, 318. 1912. — Jalander, diese Zeitschr. **36**, 435. 1911. — Jensen, O., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. II. Abt. **8**, 11. 1902. — Ivanow, Sergius, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **29**, 595. 1911. — Kanitz, A., Ber. **36**, 400. 1903. — Katz, Julius, Pringsheims Jahrbücher **31**, 599. 1898. — Kirchner, Osk., Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **6**. 1888. — Knudson, L., Journ. of Biolog. Chem. **14**. 1913. — König, J., Spieckermann, H., Bremer, W., Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **4**, 721. 1901. — Kruse, Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910. — Küster, Kultur der Mikroorganismen. Teubner, Leipzig 1913, 2. Aufl. — Kylin, H., Jahrb. f. wissensch. Botanik **53**, 465. 1914. — Lafar, Handbuch der technischen Mykologie. Fischer, Jena 1907. — Lappalainen, H., Oefversigt af Vetenskap-Societetens Förhandlingar **62**. 1919—1920. Helsingfors. Afd. R. Nr. 1. — Laxa, O., Arch. f. Hyg. **41**, 119. 1902. — Löhnis, Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie. Bornträger, Berlin 1910. — Neumann, W., H. Ztschr. f. Physiol. Chemie **45**. 1905. — Ohta, K., diese Zeitschr. **31**, 177. 1911. — Oppenheimer, K., Die Fermente. 4. Aufl. 1913; Tigerstedts Handb. d. physiol. Methodik Bd. 2, 1. Hälfte, S. 45. 1911. — Paravicini, E., Annales Mycologici **16**, Nr. 3/6. 1918. — Pesthy, S., diese Zeitschr. **34**, 147. 1911. — Pfeffer, Physiologie Bd. I, S. 85. 1897. — Pringsheim, H., Die Variabilität niederer Organismen. 1910. Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden **2**, 197. 1910. — Pringsheim und Zemplén, Géza, diese Zeitschr. **62**, 367. 1909. — Rahn, O., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. II. Abt. **15**, 53 u. 432. 1906. — Rosell, Diss. Straßburg. 1901. — Roussy, A., Compt. rend. **149**, 482. 1909; **153**, 884. 1911. — Rouge, E., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. II. Abt. **18**, 587. 1907. — Saito, K., Wochenschr. f. Brauereiwesen **27**, 181. 1910. — Salmenlinna, S., Oefversigt af Finska Vetenskaps-Societetens Förhandlingar **59**. 1916—1917. Afd. R. Nr. 9. — Schindelmeiser, J., Apoth.-Ztg. 1909, S. 837. — Schnell, E., Cen-

tralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. II. Abt. **35**, 1. 1912. — Schreiber, K., Arch. f. Hyg. **41/42**, 328; **45**, 295. 1902. — Söhngen, N. L., Academie te Amsterdam **191**, 698. 1910. — Terroine, E., diese Zeitschr. **22**, 404. 1910. — Thiele, R., Diss. Leipzig 1896. — van Tieghem, Ph., Bull. de la soc. bot. de France **27**, 353. 1881; **28**, 70 u. 137. 1882. — Treadwell, F. P., Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie. Deuticke, Leipzig 1914. — Vernon, H., Ergebn. d. Physiol. **9**, 147. 1910. — Wehmer, C., Botan. Ztg. **49**, 232. 1891. — Went, F. A. F. C., Pringsheims Jahrbücher **36**, 611. 1901. Separatabdr. aus Proceedings Vol. **21**, Nr. 4. 1918. — Wöltje, Wilh., Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. II. Abt. **48**, 97. 1918. — Zellner, J., Chemie der höheren Pilze. 1907; Monatshefte f. Chemie **32**, 1065. 1911.

Zur Beschleunigung der Blutgerinnung durch Euphyllin.

Von

R. Meißner.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 6. Mai 1921.)

Auf dem vorjährigen Kongreß für innere Medizin teilte Nonnenbruch[1]) mit, daß durch Euphylllininjektionen eine Beschleunigung der Blutgerinnung hervorgerufen würde. Die chemische Struktur dieser Substanz — des Theophyllin-Äthylendiamins — lenkte von Anfang an das Interesse auf die Frage: „Ist es die Purin- oder die Diaminkomponente, die diese beschleunigte Gerinnung des Blutes bewirkt?" Außer anderen Problemen ist Nonnenbruch auch der Beantwortung dieser Frage nachgegangen und hat in seiner Arbeit „Über einige neuartige Mittel (Euphyllin und andere Amine) zur Beschleunigung der Blutgerinnung"[2]) darüber ausführlich berichtet.

Er hat zu seinen Blutgerinnungsversuchen die Capillarblutmethode, die Methode nach Adler und die nach Fonio gewählt, die Versuche durchweg mit venösem Blut angestellt und dabei gut übereinstimmende Werte erhalten. Er kommt nach zahlreichen diesbezüglichen Experimenten an Tier und Mensch zu dem Schluß, daß „Äthylendiamin in bestimmten Säureverbindungen, so als essigsaures Äthylendiamin und besonders auch als Theophyllin-Äthylendiamin (Euphyllin) und daß außerdem das Diäthylendiamin (Piperazin) eine klinisch brauchbare, stark gerinnungsbeschleunigende Wirkung haben. Auch für das Coffein und das Theophyllin wurde eine solche Wirkung in einzelnen Fällen wahrscheinlich gemacht . . . In dem wirksamsten Versuche betrug die Gerinnungsbeschleunigung über 50%."

Gleich nach Bekanntwerden der Mitteilungen Nonnenbruchs über Euphyllin auf dem Kongreß 1920 und lange vor dem Erscheinen seiner ausführlichen Mitteilungen[3]) habe auch ich

[1]) Verhandl. d. deutschen Kongr. f. inn. Med. 1920.

[2]) Dtsch. Archiv f. klin. Med. **134**, 174.

[3]) Ich war auf dem vorjährigen Kongreß für innere Medizin persönlich nicht anwesend und bin Herrn Prof. E. Frank für seinen Hinweis auf diese Ausführungen Nonnenbruchs sehr zu Dank verpflichtet.

verschiedene Versuche ausgeführt, die dem oben skizzierten Gedankengange entsprachen. Auch ich glaubte, daß bei der einfachen und übersichtlichen Zusammensetzung des Euphyllins die Prüfung seiner Komponenten ein klares Bild von der Beeinflussung der Blutgerinnung durch Theophyllin und Äthylendiamin geben müsse. Ich habe zwar nicht so zahlreiche und vielseitige Versuche ausführen können wie Nonnenbruch und Szyszka, da mich jeder einzelne Versuch ein Tier kostete, glaube aber, mit meinen Zahlen eine ganz brauchbare Ergänzung der Ergebnisse Nonnenbruchs und Szyszkas zu liefern. Ich hatte mir von Anfang an vorgenommen, die Beeinflussung des arteriellen Blutes und seiner Komponenten am Kaninchen zu prüfen und zwar deshalb, weil ich bei dieser Versuchsanordnung größere Reibungswiderstände des austretenden Blutes an Fremdkörpern zu vermeiden glaubte. Durch Einbinden nicht zu enger, kurzer und ganz trockener Glaskanülen in die Carotis meinte ich, am besten jeder vorzeitigen Gerinnung des Blutes begegnen zu können. Ich injizierte die zu untersuchende Substanz in die Vena jugularis und fing 10 Minuten nach der Injektion immer eine bestimmte Menge Blutes auf einem trockenen Uhrschälchen auf. Dieses brachte ich sofort nach Fonio in eine feuchte Kammer und bestimmte nun ebenso wie Nonnenbruch und Szyszka die R.-Z. (Reaktionszeit = Bildung des ersten Fibrinfadens) und die G.-Z. (Gerinnungszeit = Beendigung der Gerinnung). Die Zeit der Blutentnahme: 10 Minuten nach der Injektion war willkürlich gewählt; man kann aber wohl annehmen, daß nach intravenösen Injektionen um diese Zeit eine ausgesprochene Wirkung vorhanden ist. Es beweisen dies auch einwandsfrei meine Versuche mit Euphyllin. Ich habe jedesmal sowohl von normalem Blute als von dem Blute nach der Injektion je 2 Proben zur Kontrolle abgenommen und sie in Uhrschälchen aufgefangen, die für 2 und $2^1/_2$ ccm geeicht waren. Es wurden vor und nach der Injektion natürlich nur Blutproben von gleicher Menge (entweder 2 und 2 ccm oder $2^1/_2$ und $2^1/_2$ ccm) verglichen. Meist begnügte ich mich mit den Bestimmungen 10 Minuten nach der Injektion, verschiedene Male habe ich aber die Injektionen wiederholt und die Bestimmungen nach entsprechenden Pausen wieder ausgeführt.

In folgender Tabelle (S. 200/01) stelle ich die gefundenen Werte zusammen.

Diese Versuche zeigen folgendes: Die Gerinnung des arteriellen Kaninchenblutes wird durch Euphyllin beschleunigt und zwar sowohl die R.-Z. wie die G.-Z.; einmal (Versuch 5) kam die Gerinnung so schnell zustande, daß bei einer ähnlichen Wirkung im Tierkörper mit starker Thromben- und Emboliebildung gerechnet werden mußte. Meine 5 Euphyllinversuche bringen eine ganz klare Bestätigung der Nonnenbruchschen Angaben betreffs der Wirkung des Euphyllins.

Was nun die Wirkung der Euphyllinkomponenten anbetrifft, so möchte ich mich nicht ohne weiteres der Ansicht Nonnenbruchs und Szyszkas anschließen. Zwar zeigen auch meine Zahlen, daß einige Diamine die Blutgerinnung sichtlich beschleunigen. Ich verweise hier auf Versuch 13 mit Pentamethylendiamin, wo besonders nach der 2. Injektion eine sehr starke Wirkung zu erkennen ist und auf die Versuche Nr. 10 und 11 mit Diäthylendiamin, bei denen die R.-Z. stark beeinflußt wurde. Andererseits zeigte die Prüfung auf Ortho-Phenylendiamin selbst in hohen Dosen überhaupt keine Wirkung.

Das hier besonders interessierende Äthylendiamin setzte die R.-Z., die Phase also, auf welche Nonnenbruch und Szyszka den größten Wert legen, einmal deutlich (Versuch 8) und einmal sehr stark (Versuch 9) herab. 2mal beeinflußte es die R.-Z. allerdings gar nicht. Auch die G.-Z. wurde, abgesehen von Versuch 8, vermindert, allerdings nur in mäßigem Grade. Ich möchte somit dem Äthylendiamin und zwar sowohl dem alkalischen, wie dem mit HCl abgestumpften, eine gewisse, aber nur eine mäßig starke Beschleunigung der Blutgerinnung zuschreiben. Viel deutlicher trat diese bei meinen Versuchen mit Theophyllin zutage. Abgesehen von Versuch 21 war bei den anderen die R.-Z. um mehrere Hundert Prozent und die G.-Z. auch einige Male um 50% herabgesetzt. Das spricht so deutlich für eine gerinnungsbefördernde Wirkung, daß ich in meinen Versuchen der Purinkomponente des Euphyllins die stärkere Wirkung zuerkennen muß. Einige Male haben ja auch Nonnenbruch und Szyszka eine beschleunigte Wirkung durch Theophyllin wahrgenommen und die gerinnungsbeschleunigende Wirkung des Coffeins, wie sie Sackur fand, spricht auch für diese Purinwirkung.

Bei der stark alkalischen Reaktion des Euphyllins hatte ich mit der Möglichkeit gerechnet, daß die Gerinnungsbeschleuni-

Versuch Nr.	Mit	Gewicht des Tieres g	Normale Werte R.-Z.	Normale Werte G.-Z.	Injiziert bei 1. Injektion
1	Euphyllin	1100	5½ 6½	21 21½	0,03 g in 2½ ccm NaCl physiologisch
2	„	1100	4 5	31½ 32	0,1 g in 5 „ „ „
3	„	1400	2 2½	23 23½	0,14 g in 5 „ „ „
4	„	1900	3 3	26 29	0,18 g in 7 „ „ „
5	„	1200	7 8	16 17	0,12 g in 5 „ „ „
6	Äthylendiamin	1450	7 10	27 33	0,03 g stark alkalisch
7	„	2050	2½ 3½	34 40	0,65 g schwach alkalisch
8	„	1150	7 7½	21 21	0,3 g „ „
9	„	2100	8 8	13 14	0,65 g „ „
10	Diäthylendiamin	1800	8 8	83 87½	1,0 g in 10 ccm NaCl schwach alkalisch
11	„	2100	4½ 4½	42 46	1,5 g in 10 „ „ „ „
12	Pentamethylendiamin	1400	5½ 5½	30 30	0,3 g in 3 „ „ „ „
13	„	1700	3½ 4	83 87	0,4 g in 4 „ „ „ „
14	Ortho-Phenylendiamin	1700	3 3½	30 33	0,25 g schwach alkalisch, warm injiziert
15	„	1800	2½ 2½	75 80½	1,4 g „ „ „ „
16	Para-Phenylendiamin	1800	4 4	59 61	0,35 g schwach alkalisch
17	Natronlauge	2000	1 1½	18 24	4 gtts. 10% NaOH + 5 ccm NaCl
18	„	1700	5 5½	39 43	4 „ 10% „ + 5 „ „
19	„	1500	2 2	10½ 12½	4 „ 10% „ + 5 „ „
20	„	1500	2 2½	31 51	4 „ 10% „ + 5 „ „
21	Theophyllin*)	1800	3 4½	12 16½	0,14 g + 10 ccm NaCl schwach alkalisch
22	„	2000	4 4½	47 50	0,15 g in 5 ccm NaCl**) „ „
23	„	2100	6½ 6½	76 85	0,15 g in 5 „ „ „ „
24	„	1450	7 7½	34 37	0,11 g in 5 „ „ „ „
25	„	1200	7 7	26½ 27½	0,09 g in 5 „ „ „ „

*) Theophyllin Böhringer und Theocin Merck wurden verwandt.
**) Mit 10% NaOH abgestumpft.

Werte 10 Min. nach 1. Inj.		Injiziert wurden bei der 2. Injektion	Werte 10 Min. nach 2. Inj.		Bemerkungen	Versuch
R.-Z.	G.-Z.		R.-Z.	G.-Z.		Nr.
4	14		2	10		1
4½	14	0,03 g in 2½ ccm NaCl physiol.	3	10½		
2½	19		—	—	30 Min. n. d. 1. Inj. R.-Z. 2½, G.-Z. 28.	2
2½	21		—	—	„ „ 3 „ „ 30.	
½	8		—	—	45 „ „ „ 1. „ „ „ 3½ „ „ 21½.	3
	13		—	—	„ „ 4½ „ „ 25.	
½	18½		—	—		4
½	21		—	—		
1	1½		—	—		5
1	2		—	—		
9	16		9	22	3. Inj. 0,6 neutr. 10 Min. sp. R.-Z. 6, G.-Z. 24.	6
11	24	0,3 neutral	9	32	„ 7 „ 29.	
3	26		6	44		7
3½	28	1,2 schwach alkalisch	8	46	Kurz nachher Exitus.	
4	21		—	—		8
5	22		—	—		
2	9½		—	—		9
2	12		—	—		
2	66½		—	—		10
3	95		—	—		
½	46		—	—		11
1	51		—	—		
6	21		—	—		12
6½	23½		—	—		
2	53		½	30		13
2½	62	0,2 in 2 ccm NaCl, schwach alkal.	1	33		
2	29½		—	—		14
3	32½		—	—		
6½	71		—	—		15
7	84		—	—		
2½	51½		—	—		16
2½	54		—	—		
½	18		½	13		17
1	21	8 gtts. NaOH in 5 ccm NaCl phys.	1	21		
2½	30		—	—		18
3	35		—	—		
1	7½		½	10½		19
1	12½	4 gtts. NaOH in 5 ccm NaCl phys.	½	16½		
1½	11½		3	20	3. Inj. 5 gtts. NaOH in 10 ccm NaCl	20
2½	30	8 gtts. NaOH in 5 ccm NaCl phys.	3½	23½	10 Min. n. 3. Inj. R.-Z. 1, G.-Z. 24½.	
					„ 1, „ 27½.	
4	11		6	20		21
4½	12½	0,14 in 10 ccm NaCl, schwach alkal.	6	26½		
1	21		1	19	Es wurde ganz langsam injiziert.	22
1½	30	0,13 in 5 ccm NaCl, schwach alkal.	1	25	Tier blieb dauernd ruhig.	
1	57		—	—		23
1	63		—	—	„ „ „ „	
2	36		—	—		24
3	38		—	—	„ „ „ „	
½	11		—	—		25
1	11½		—	—	Tier war unruhig.	

gung auf eine Alkaliwirkung zurückzuführen sei. Ich prüfte deshalb den Einfluß des NaOH auf die Gerinnung, fand aber hierbei keine nennenswerte Beschleunigung. Ebensowenig waren die zeitweise einsetzenden Krämpfe nach Euphyllin und Theophyllin die Ursache derselben. Endlich war auch die Diurese scheinbar nicht an der Gerinnungsbeschleunigung beteiligt, denn diese setzte auch bei Harnverhaltung der Tiere ein. Nonnenbruch und Szyszka haben sich bei Beurteilung der Frage, ob den Purinen oder den Diaminen die ausschlaggebende Wirkung zukommt, vorsichtig geäußert und den Diaminen nur bedingt die Hauptwirkung zugeschrieben. Ich möchte mit meinem Urteil auch zurückhaltend sein und es dahin zusammenfassen, daß eine summierende Wirkung der schwächeren Diamine und der stärkeren Purinkomponente hier zu der einwandsfreien starken Wirkung des Euphyllins führt. Es liegen hier vielleicht ähnliche Verhältnisse vor wie in der Gruppe der Digitalis, wo sich die stark wirksamen Glykoside aus 2 weniger wirksamen Komponenten zusammensetzen. Aber ich will auch nicht unausgesprochen lassen, daß die Versuchsanordnung und die Beurteilung der Versuche bei der hier zur Diskussion stehenden Frage mir nicht ganz einwandsfrei erscheint, weniger deswegen, weil man bei arteriell ausströmendem Blut, wenn man es eben nicht durch enge Passagen schicken will, nicht genau auf den Tropfen abmessen kann als vielmehr deswegen, weil die Tiere normaliter eine sehr verschiedene Gerinnungszeit zeigten, und der Einfluß auf normal hochstehende Zahlen mir viel größer erschien als auf niedere Normalwerte.

Die Wirkung einiger Verwandten des Chloroforms mit besonderer Berücksichtigung der Traubeschen Theorie über die Wirkung der Narkotica der Fettreihe.[1])

Von

Georg Joachimoglu.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 9. Mai 1921.)

Seit einer Reihe von Jahren sind in unserem Institut systematische Untersuchungen über die Wirkung einiger Halogenkohlenwasserstoffe angestellt worden, die zwar noch nicht ganz abgeschlossen sind, aber schon heute einige Betrachtungen allgemeiner Natur gestatten. Aus diesem Grunde erschien es mir zweckmäßig, im Zusammenhang kurz darüber zu berichten.

Im Anschluß an frühere Untersuchungen von Heffter und Joachimoglu[2]) über die Toxikologie des Tetrachloräthans hat Plötz[3]) die hämolytische Wirksamkeit der in Frage kommenden Körper verglichen. Zu diesen Versuchen wurde Meerschweinchenblut und Hundeblut benutzt. Aus vielen Versuchen wurden die Mittelwerte, die Hämolyse hervorrufen, festgestellt und der vergleichenden Betrachtung zugrunde gelegt. Von den geprüften Verbindungen, nämlich: Dichlormethan, Chloroform, Tetrachlormethan, Äthylendichlorid, Äthylidenchlorid, Tetrachloräthan, Pentachloräthan, Hexachloräthan, Dichloräthylen, Trichloräthylen, Tetrachloräthylen, konnte durch Penta-, Hexachloräthan und den Derivaten des Äthylens keine Hämolyse erzielt werden, weil diese Körper zum Teil in Wasser sehr wenig löslich, auch in den stärksten Konzentrationen, die in Wasser möglich sind, eine Hämolyse nicht hervorrufen. Setzt man die hämolytische Wirksamkeit des Chloroforms = 1, so betragen die entsprechenden Zahlen bei Dichlormethan 0,42, bei Tetrachlormethan 10,5, beim Äthylendichlorid 0,52, beim Äthylenchlorid 0,95 und beim Tetrachloräthan 6. Die hämolytische Wirksamkeit nimmt demnach in der Reihenfolge Tetrachlor-

[1]) Vorgetragen in der Physiologischen Gesellschaft am 6. V. 1921.

[2]) Heffter und Joachimoglu, Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Med. u. öff. Sanitätsw. **48** (Suppl.). 1914.

[3]) Diese Zeitschr. **103**, 243. 1920. In dieser Arbeit finden sich auch nähere Angaben über die Löslichkeit dieser Körper. Vgl. auch Kiessling, diese Zeitschr. **114**, 294. 1921.

methan, Tetrachloräthan, Chloroform, Äthylidenchlorid, Äthylendichlorid, Dichlormethan ab.

Es war nun von großem Interesse, diese Verbindungen noch in bezug auf andere Wirkungen zu prüfen, um festzustellen, ob ähnliche in Zahlen ausdrückbare Beziehungen bestehen. Wir prüften zunächst die narkotische Wirkung. Zur Feststellung der narkotischen Wirksamkeit haben wir folgende Versuchsanordnung gewählt: Wir brachten kleine Süßwasserfische (Moorkarpfen) in wässerige (Leitungswasser) Lösungen des zu prüfenden Körpers und bestimmten, bei welcher Konzentration innerhalb 15 Minuten eine vollständige Narkose eintritt, d. h. das Tier auf der Seite liegt und bei Berührungen Reflexe nicht auftreten. Die molare Konzentration, welche in der erwähnten Versuchsanordnung zur Narkose führt, beträgt bei Dichlormethan 0,008, Chloroform 0,0025, Tetrachlormethan 0,0016, Äthylendichlorid 0,002, Äthylidenchlorid 0,0009, Tetrachloräthan 0,00019, Pentachloräthan 0,000123, Hexachloräthän 0,00004225, Dichloräthylen 0,007, Trichloräthylen 0,0001902, Tetrachloräthylen 0,0004. Die narkotische Wirksamkeit nimmt also in der Reihenfolge Hexachloräthan, Pentachloräthan, Tetrachloräthan, Trichloräthylen, Tetrachloräthylen, Äthylidenchlorid, Tetrachlormethan, Chloroform, Äthylendichlorid, Dichloräthylen, Dichlormethan ab. Wird die narkotische Wirkung des Chloroforms = 1 gesetzt, so beträgt die Wirksamkeit bei Dichlormethan 0,31, Tetrachlormethan 1,5, Äthylendichlorid 1, Äthylidenchlorid 2,7, Tetrachloräthan 13,1, Pentachloräthan 20, Hexachloräthan 59,1, Dichloräthylen 0,37, Trichloräthylen 13,1, Tetrachloräthylen 6,2. Schon diese 2 Versuchsreihen zeigen uns, daß hämolytische und narkotische Wirkung keineswegs parallel gehen. Tetrachlormethan, das in bezug auf Hämolyse an erster Stelle steht, in bezug auf Narkose an 6. Stelle (vgl. Tabelle II). In der Methan- und Äthanreihe nimmt mit der Zahl der Chloratome im Molekül die narkotische und hämolytische Wirkung zu. In der Äthylenreihe finden wir eine Ausnahme von dieser allgemein anerkannten Regel, denn Trichloräthylen wirkt stärker narkotisch als Tetrachloräthylen.

Man könnte geneigt sein anzunehmen, daß Äthylendichlorid $\begin{pmatrix} CH_2Cl \\ | \\ CH_2Cl \end{pmatrix}$ und Äthylidenchlorid $\begin{pmatrix} CH_3 \\ | \\ CHCl_2 \end{pmatrix}$ gleich wirksam seien, weil sie gleiche Mengen von Chlor enthalten. Auch dies trifft nicht zu. Sowohl in Bezug auf die narkotische als auch hämolytische Wirkung ist Äthylidenchlorid wirksamer als Äthylendichlorid.

Über die Wirkung dieser Körper am isolierten Froschherzen hat Kiessling[1]) in unserem Institut neuerdings Versuche angestellt. Er stellte die Konzentration fest, die am isolierten Herzen von Landfröschen in der Straubschen Versuchsanordnung Herzstillstand hervorruft. In Mol ausgedrückt betragen die entsprechenden Zahlen für Dichlormethan 0,0433, Chloroform 0,0224, Tetrachlormethan 0,004, Äthylendichlorid 0,0283, Äthylidenchlorid 0,00858, Tetrachloräthan 0,002989, Pentachloräthan 0,0008368, Dichloräthylen 0,011, Trichloräthylen 0,0076. Wird die Wirk-

[1]) Diese Zeitschr. **114**, 292. 1921.

samkeit des Chloroforms in bezug auf das isolierte Froschherz = 1 gesetzt, so beträgt die Wirksamkeit des Dichlormethans 0,5, Tetrachlormethans 5, Äthylendichlorid 0,8, Äthylidenchlorid 2,6. Tetrachloräthan 7,5, Pentachloräthan 26, Dichloräthylen 2, Trichloräthylen 2,9. Während Hexachloräthan in bezug auf Narkose an erster Stelle steht, zeigte die wässerige Lösung dieser Verbindung am isolierten Froschherzen keine Wirkung. Freilich ist dieser Körper in Wasser sehr wenig löslich (0,01 g in 1 Liter Wasser).

Die Wirksamkeit in bezug auf das isolierte Froschherz nimmt in der Reihenfolge Pentachloräthan, Tetrachloräthan, Tetrachlormethan, Trichloräthylen, Äthylidenchlorid, Dichloräthylen, Chloroform, Äthylendichlorid, Dichlormethan ab. Plagge[1]) wird in seiner Dissertation Versuche mitteilen, welche sich mit der Wirkung unserer Chlorderivate auf die Hefegärung beschäftigen. Es wurde bestimmt, welche Konzentration die Hefegärung (Preßhefe) vollständig hemmt. Wie bei den Versuchen mit Blutkörperchen konnte durch Penta- und Hexachloräthan und durch die Derivate des Äthylens in gesättigten wässerigen Lösungen eine vollständige Hemmung der Gärung nicht erzielt werden. Ebenso verhielt sich in diesen Versuchen das Tetrachlormethan, welches, wie oben erwähnt, die stärkste hämolytische Wirkung zeigte. Die gefundenen Konzentrationen betragen in Mol ausgedrückt bei Dichlormethan 0,233, Chloroform 0,031, Äthylendichlorid 0,065, Äthylidenchlorid 0,0593, Tetrachloräthan 0,007. Wird die Wirksamkeit des Chloroforms in bezug auf die Hefegärung = 1 gesetzt, so beträgt die Wirksamkeit des Dichlormethans 0,132, des Äthylendichlorids 0,47, des Äthylidenchlorids 0,52 und des Tetrachloräthans 4,53. Die Wirksamkeit nimmt demnach in der Reihenfolge Tetrachloräthan, Chloroform, Äthylidenchlorid, Äthylendichlorid, Dichlormethan ab. Die Ergebnisse der obenerwähnten Versuche sind in Tabelle I (S. 206) zusammengestellt. Weiter haben wir das Verhalten dieser Verbindungen auf den Stoffwechsel untersucht[2]). Aus den oben erwähnten Untersuchungen von Heffter und Joachimoglu[3]) geht hervor, daß das Tetrachloräthan schwere Schädigungen des Stoffwechsels hervorruft. Bei verschiedenen Applikationsarten konnten bei Tieren starke Organverfettungen hervorgerufen werden. Von Chloroform ist ebenfalls schon lange bekannt, daß es Veränderungen der Leber, die zu Icterus, ja zu akuter gelber Leberatrophie führen können, hervorruft. Nach Chloroformnarkosen bei Menschen sind derartige Veränderungen wiederholt beobachtet worden. Die Prüfung der Wirkung einiger Chlorderivate auf den Stoffwechsel ergab nun folgendes: Dichloräthylen und Pentachloräthan sind als starke Stoffwechselgifte anzusehen, während Trichloräthylen und Tetrachloräthylen eine derartige Wirkung nicht zeigen. Es wird meist angenommen, daß ungesättigte Verbindungen wirksamer sind als gesättigte. Wir sehen, daß dies nicht der Fall ist, denn Chloroform, Tetrachlor- und Pentachloräthan sind gesättigte Verbindungen und stellen starke Stoffwechselgifte dar, während Tri- und Tetrachloräthylen,

[1]) Diese Zeitschr. **118**, 129. 1921.

[2]) Vgl. Berl. klin. Wochenschr. 1921. Nr. 7, S. 147.

[3]) A. a. O.

Tabelle I.

Substanz	Hämolytische Konzentration	Narkotische Konzentration	Konzentration, die Ventrikelstillstand hervorruft	Konzentration, welche die Hefegärung hemmt	Hämolytische Zahl	Narkotische Zahl	Wirkungszahl auf Grund d. Herzwirkung	Wirkungszahl auf Grund der Wirkung auf die Gährung
	Grammoleküle im Liter					Chloroform = 1		
Dichlormethan CH_2Cl_2	0,045	0,008	0,0435	0,23346	0,42	0,31	0,5	0,132
Chloroform $CHCl_3$	0,019	0,0025	0,0224	0,031	1,0	1,0	1,0	1,0
Tetrachlormethan CCl_4	0,0016	0,0016	0,004	—	10,5	1,5	5,0	—
Äthylendichlorid CH_2Cl | CH_2Cl	0,036	0,002	0,0283	0,065	0,52	1,0	0,8	0,47
Äthylidenchlorid CH_3 | $CHCl_2$	0,019	0,0009	0,00858	0,0593	0,95	2,7	2,6	0,52
Tetrachloräthan $CHCl_2$ | $CHCl_2$	0,003	0,00019	0,002989	0,007	6,0	13,1	7,5	4,53
Pentachloräthan CCl_3 | $CHCl_2$	—*)	0,000123	0,0008368	—	—	20,0	26,0	—
Hexachloräthan CCl_3 | CCl_3	—	0,00004225	—	—	—	59,1	—	—
Dichloräthylen $CHCl$ ‖ $CHCl$	—	0,007	0,011	—	—	0,37	2,0	—
Trichloräthylen $CHCl$ ‖ CCl_2	—	0,0001902	0,0076	—	—	13,1	2,9	—
Tetrachloräthylen CCl_2 ‖ CCl_2	—	0,0004	—	—	—	6,2	—	—

*) — bedeutet, daß die stärkste im Wasser mögliche Konzentration keine Wirkung zeigt.

ungesättigte Verbindungen, eine derartige Wirkung vermissen lassen. Die Tatsache, daß Dichloräthylen im Gegensatz zum Tri- und Tetrachloräthylen auf den Stoffwechsel wirkt, weist nochmals daraufhin, daß der Satz, wonach die Wirksamkeit der Narcotica mit der Zahl der Chloratome im Molekül zunimmt, keine allgemeine Gültigkeit haben kann.

Es ist interessant, daß einige Verbindungen noch eine spezifische Wirkung auf die Hornhaut des Auges zeigen.

Ich habe darüber mit Herrn K. Steindorff vergleichende Untersuchungen angestellt, welche kurz folgendes ergeben haben.

Äthylendichlorid und Dichloräthylen haben die Eigenschaft, eine Trübung der Hornhaut bei Hunden hervorzurufen. Die Wirkung tritt nicht auf, wenn man eine wässerige Lösung der genannten Verbindungen in den Konjunktivalsack einträufelt, oder sie in einer dicht schließenden Metallkappe vor dem Auge verdampfen läßt. Wird dagegen das Tier mit den genannten Verbindungen narkotisiert, so tritt schon 6 Stunden später eine oberflächliche Trübung der Hornhaut auf. Auch nach subcutaner Injektion können solche Trübungen auftreten. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß es sich um ein Ödem der Hornhaut handelt. Das Endothel wird nekrotisch, das Kammerwasser dringt in das Hornhautgewebe ein und drängt die Fibrillen auseinander.

Die wiederholten Hinweise der verschiedenen Wirksamkeiten dieser Verbindungen je nach dem Versuchsobjekt treten uns klar vor Augen bei Betrachtung der Tabelle II (S. 208). Es ist klar, daß jede Theorie, welche auf Grund der Zusammensetzung eines Körpers oder seiner physikalischen Eigenschaften die feineren Unterschiede der pharmakologischen Wirkung erklären will, hier versagen muß. Nehmen wir an, eine Verbindung wirkt stark narkotisch, weil sie einen hohen Teilungskoeffizienten aufweist, so ist damit nicht erklärt, warum dieselbe Verbindung schwach hämolytisch wirkt. Ebensowenig können wir erklären, warum die eine Verbindung auf den Stoffwechsel wirkt, die andere nicht.

Es sei noch einmal daran erinnert, daß Tetrachlormethan in bezug auf Hämolyse an erster Stelle steht in bezug auf Narkose an 6. Stelle. Wenn gesagt wird, daß eine Verbindung wirksamer ist als eine andere, so ist damit sehr wenig ausgesagt, wenn nicht gleichzeitig angegeben wird, welche Wirkung man zu dem Vergleich der zwei Verbindungen herangezogen hat. Es lag nicht im Plan meiner Untersuchungen, einen Beitrag zu den Narkosetheorien zu liefern. Bei der Prüfung der Oberflächenaktivität dieser Verbindungen mußte ich mich aber mit der Traubeschen Theorie beschäftigen und konnte dabei einige Tatsachen feststellen, die ich hier noch erwähnen möchte. Ich muß zunächst das Wesentliche dieser Theorien kurz skizzieren. Es wird dabei nicht möglich sein, die zahlreichen Arbeiten Traubes heranzuziehen, oder sie gar kritisch zu beleuchten. Ich beschränke mich darauf, die letzte Arbeit dieses Forschers über diesen Gegenstand zu berück-

Tabelle II.

Steht an	In Bezug auf			
	Hämolyse	Narkose	Die Wirkung auf das isolierte Froschherz	Die Hefegärung
1. Stelle	Tetrachlormethan CCl_4	Hexachloräthan CCl_3 | CCl_3	Pentachloräthan CCl_3 | $CHCl_2$	Tetrachloräthan $CHCl_2$ | $CHCl_2$
2. Stelle	Tetrachloräthan $CHCl_2$ | $CHCl_2$	Pentachloräthan CCl_3 | $CHCl_2$	Tetrachloräthan $CHCl_2$ | $CHCl_2$	Chloroform $CHCl_3$
3. Stelle	Chloroform $CHCl_3$	Tetrachloräthan $CHCl_2$ | $CHCl_2$ Trichloräthylen $CHCl$ || CCl_2	Tetrachlormethan CCl_4	Äthylidenchlorid CH_3 | $CHCl_2$
4. Stelle	Äthylidenchlorid CH_3 | $CHCl_2$	Tetrachloräthyl. CCl_2 || CCl_2	Trichloräthylen $CHCl$ || CCl_2	Äthylendichlorid CH_2Cl | CH_2Cl
5. Stelle	Äthylendichlorid CH_2Cl | CH_2Cl	Äthylidenchlorid CH_3 | $CHCl_2$	Äthylidenchlorid CH_3 | $CHCl_2$	Dichlormethan CH_2Cl_2
6. Stelle	Dichlormethan CH_2Cl_2	Tetrachlormethan CCl_4	Dichloräthylen $CHCl$ || $CHCl$	—
7. Stelle	—	Chloroform $CHCl_3$ Äthylendichlorid CH_2Cl · | CH_2Cl	Chloroform $CHCl_3$	—
8. Stelle	—	Dichloräthylen $CHCl$ || $CHCl$	Äthylendichlorid CH_2Cl | CH_2Cl	—
9. Stelle	—	Dichlormethan CH_2Cl_2	Dichlormethan CH_2Cl_2	—

sichtigen[1]). Nach Traube kann für die physikalischen Eigenschaften (Oberflächenaktivität, Löslichkeit, Adsorption, die osmo-

[1]) J. Traube, Die physikalische Theorie der Arzneimittel- und Giftwirkung. Diese Zeitschr. 98, 177. 1919. Schon der Titel dieser Arbeit wird jeden Pharmakologen befremden, denn man kann aus prinzipiellen Gründen eine Arzneimittelwirkung von einer Giftwirkung nicht unterscheiden.

tischen Eigenschaften, Reibung, Dispersität usw.), welche für die pharmakologischen Wirkungen eines Körpers maßgebend sind, ein einheitlicher Gesichtspunkt gewonnen werden, wenn der Begriff des „Haftdrucks" eingeführt wird. „Unter Haftdruck des Stoffes oder Haftintensität wird die Anziehung verstanden, die zwischen dem betreffenden Stoffe und dem Lösungsmittel, beispielsweise dem Wasser, besteht usw." „Je kleiner der Haftdruck ist (in bezug auf Wasser), um so größer ist die Oberflächenaktivität der betreffenden Lösung, vorausgesetzt, daß sich es nicht etwa um lösliche oder so flüchtige Stoffe handelt wie Chloroform[1]). Danach ist man imstande, durch Bestimmung von Oberflächenspannungen mit Hilfe der bekannten Tropfmethode wenigstens in qualitativer Reihenfolge bei nicht allzu flüchtigen Stoffen den Haftdruck zu messen." Speziell über die Narkotica wird weiter gesagt: „Narkotische Kraft und Oberflächenaktivität gehen im allgemeinen parallel".

Nach Traube ist also kleiner Haftdruck bezw. große Oberflächenaktivität Eigenschaft aller Narkotica der Fettreihe. Wenn wir nun eine wässrige Lösung der oben erwähnten Chlorderivate auf ihre Oberflächenaktivität untersuchen, so finden wir, daß die Oberflächenspannung des Wassers durch darin gelöstes Chloroform oder eine der anderen Verbindungen nicht im geringsten verändert wird. Ich habe seiner Zeit mit Plötz zahlreiche stalagmometrische Versuche ausgeführt mit vollständig negativem Resultat. Neuerdings habe ich diese Versuche noch mit einem Viskostagonometer[2]) wiederholt. Auch hier konnte keine Änderung der Oberflächenspannung des Wassers durch darin gelöste Halogen-Kohlenwasserstoffe nachgewiesen werden. Bezüglich des Chloroforms hat Traube auf Grund von Versuchen seines Schülers Berzeller[3]) behauptet: „Die nach der Tropf- oder auch Steighöhenmethode gemessene Oberflächenspannung der wässrigen Lösung wird bei Chloroform und anderen derartigen flüchtigen Stoffen (auch bei Äther) zu groß gefunden, weil aus der Oberfläche wegen des großen Dampfdruckes ständig Substanz in die benachbarte Luft (oder sonstige Phase) diosmiert."

[1]) Im Original nicht gesperrt.

[2]) Herr Prof. Traube hatte die Freundlichkeit, mich auf diesen sehr praktischen und einfachen Apparat aufmerksam zu machen.

[3]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **153**, 307. 1913.

Ich möchte gleich hier betonen, um Irrtümer zu vermeiden, daß die Versuche von Berzeller mit Chloroformemulsionen ausgeführt worden sind, während bei unseren Versuchen nur absolut klare Lösungen angewandt wurden. Soweit ich die Literatur übersehe, sind bei den anderen Verbindungen, außer dem Chloroform, Bestimmungen der Oberflächenspannung bis jetzt nicht ausgeführt worden. Wenn nun die Annahme Traubes, daß Chloroform als eine flüchtige Substanz aus der Oberfläche in die Luft diosmiert, und aus diesem Grunde die Oberflächenspannung zu groß gefunden wird, richtig ist, so muß eine Chloroformlösung, da nach Traube dieses „Diosmieren" so schnell vor sich geht, daß ein Ausschlag bei der stalagmometrischen Messung ausbleibt, unwirksam werden, wenn man sie an der Luft stehen oder ein Stalagmometer passieren läßt. Zur Nachprüfung habe ich folgende Versuche aufgeführt:

Versuch A: Ringerlösung, die in 1000 ccm 1,8 ccm Chloroform enthält, wird durch ein Stalagmometer geschickt und dann in ein isoliertes Froschherz gebracht. Es erfolgt prompt Stillstand.

Dieser Versuch zeigt uns, daß die Lösung auch nach dem Passieren des Stalagmometers Chloroform enthält. Die gewählte Konzentration, 1,8 ccm in 1000 ccm Ringerlösung, ist die Grenzkonzentration, die nach den Versuchen von Kiessling Stillstand hervorruft. Wir sehen also, daß das Chloroform bei der stalagmometrischen Messung nicht in die Luft diosmiert. Da eine Lösung, die in 1000 ccm Wasser 1,5 ccm Chloroform enthält, einen Stillstand nicht hervorruft, so können wir mit Bestimmtheit sagen, daß bei der Stalagmometermessung nicht mehr Chloroform verlorengegangen ist, als der Menge von 0,3 ccm Chloroform in 1000 ccm Wasser entspricht. Wenn wir nun berücksichtigen, daß eine wässerige, gesättigte Chloroformlösung in 1000 ccm beinahe 3 mal soviel Chloroform enthält (5 ccm in 1000 ccm) als die Lösung, die wir zu dem Herzversuch benutzt haben, so sehen wir, daß trotz dieser großen Menge, welche das Wasser enthält, seine Oberflächenaktivität nicht verändert wird. Bedenkt man, daß Körper, die viel weniger narkotisch wirken als Chloroform, eine starke Oberflächenaktivität zeigen, von Amylalkohol genügt ein Gehalt von 0,05 ccm in 1000 ccm Wasser, um eine sehr deutliche Zunahme der Oberflächenaktivität hervorzurufen), so müssen wir zu dem Schluß kommen, daß die pharmakologische Wirkung der hier geprüften Verbindungen unmöglich durch Oberflächenaktivität bedingt sein kann.

Daß eine Chloroformlösung nach Passieren des Stalagmometers erhebliche Mengen Chloroform enthält, kann auch in einfacher Weise auf chemischem Wege nachgewiesen werden.

Versuch B: Eine gesättigte wässerige Chloroformlösung passiert ein Stalagmometer. Die tropfenweise aufgefangene Lösung wird mit

einem Tropfen Anilin und alkoholischer Kalilauge schwach erhitzt. Der widerliche Isonitrilgeruch ist sofort wahrzunehmen. Wird die Lösung mit Resorcin und Natronlauge zum Sieden erhitzt, so zeigt sich eine rote Färbung, beim starken Verdünnen ist eine Fluorescenz wahrzunehmen. Auch reduziert die aus dem Stalagmometer gewonnene Chloroformlösung Fehlingsche Lösung.

Wir haben gesehen, daß nicht nur wässerige Chloroformlösungen, sondern auch die anderen Verwandten des Chloroforms die Oberflächenspannung des Wassers nicht beeinflussen. Sie können also unmöglich zu den capillaraktiven Stoffen gerechnet werden.

Von anderen Halogenverbindungen habe ich noch in Gemeinschaft mit Dr. Devrient das Bromoform geprüft. Seine Löslichkeit beträgt in Wasser 0,3 ccm im Liter. Die Messung mit einem Viscostagonometer, bei welchem ein Tropfen Wasser 120 Teilstrichen entsprach, ergab für die Bromoformlösung denselben Wert. Dagegen ruft eine Ringerlösung, die im Liter 0,18 ccm Bromoform enthält, am isolierten Froschherzen sofort Stillstand hervor. Der Versuch zeigt, daß nicht nur die geprüften Chlorderivate des Methans, Äthans und Äthylens eine Beeinflussung der Oberflächenspannung des Wassers nicht zeigen, sondern auch Bromderivate.

Damit dürfte erwiesen sein, daß Oberflächenaktivität und Narkose wenigstens für die hier geprüften Verbindungen nichts miteinander zu tun haben.

Das Ergebnis unserer Untersuchungen steht in Übereinstimmung mit den kürzlich von H. Führer (diese Zeitschr. 115, 259. 1921) mitgeteilten Befunden, wonach Chloroformlösungen nicht capillaraktiv sind. Dasselbe Verhalten zeigen Lösungen von Pentan, Hexan und Octan.

Die Narkosetheorien, die bis jetzt aufgestellt worden sind, dürfen wir mit Höber[1]) nur als Erklärungsmöglichkeiten ansehen, und nicht als wohl fundierte Lehren. Aber auch eine Erklärungsmöglichkeit müssen wir fallen lassen, wenn sie so im Widerspruch mit den Tatsachen steht.

[1]) Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Berlin 1914, S. 471.

Über Alkaptonchromogene.

Von

G. Katsch und Géza Német.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 10. Mai 1921.)

Es ist bekannt, daß aus der Homogentisinsäure — der Charaktersubstanz des Alkaptonharns — nicht nur das berühmte braunschwarze Alkaptonmelanin entsteht, sondern gelegentlich auch andere Farbentönungen. Besonders Moerner[1]) hat die Bedingungen untersucht, unter denen aus Homogentisinsäure eine rote Farbe entsteht — er nennt sie Alkaptochrom —. Und Katsch[2]) gewann eine ganze Farbenskala aus Alkaptonharn oder reiner Homogentisinsäurelösung, indem er steigende Mengen von H_2O_2 hinzusetzte und so eine abgestufte Oxydation bewirkte.

Wir wollen dem eine Farbreaktion hinzufügen, die zuerst unser Laborant, Herr Lindt, aufgefunden hat, und die sich uns als brauchbare Reaktion auf Homogentisinsäure erwies: Nimmt man Homogentisinsäure in etwas Äther auf, z. B. indem man eine Alkaptonharnprobe mit wenigen Kubikzentimeter Äther im Reagensglas ausschüttelt und gießt man diesen Äther über ein Stück ungebrannten Kalk, so entsteht eine mehr oder weniger flüchtige lebhafte Blaufärbung. Hinterher bleibt ein gelblicher oder hellbrauner Fleck zurück. Man gewinnt den Eindruck, daß der abdunstende Äther den Oxydationsablauf so abändert, daß vorübergehend dieser blaue Farbton (Alkaptocyan) zum Vorschein kommt. Die Probe ist recht empfindlich; sie ist noch positiv bei einem Gehalt des Äthers an Homogentisinsäure von 0,1 pro Mille[3]).

[1]) Mörner, Zeitschr. physiol. Chemie **69**, 329. 1911.

[2]) Katsch, Münch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 44, S. 1207.

[3]) Diese Probe dürfte als eine praktische Abänderung der von Huppert angegebenen Reaktion (Dtsch. Arch. f. klin. Med. **64**, 129. 1899), zit. nach Pincussohn, Ergebn. d. inn. Med. **8**, 458. 1912) angesehen werden. Nach Huppert entsteht Blaufärbung an den mit Lauge benetzten Rändern der krystallinischen Homogentisinsäure. Dieser Probe muß also die Reindarstellung vorangehen, während die Kalkprobe eine Urinreaktion ist.

Kann man von diesen verschiedenen Farbentönen als Alkaptonfarbstoffen sprechen, so ergaben weitere Beobachtungen das Vorkommen von Substanzen, die zweckmäßig als Alkaptonchromogene benannt werden. Bei Studien über „relative Alkaptonurie" fand Katsch, daß manche Kranke (Leberleidende usw.) verfütterte Homogentisinsäure nicht restlos verbrennen wie der Gesunde, sondern gewisse Mengen davon im Harn ausscheiden. Ein Teil dieser Beobachtungen ist niedergelegt in der Dissertation von Arthur Wiltmann, Marburg 1920. In anderen Fällen kam es, auch bei Gesunden, zwar nicht zur Ausscheidung von Homogentisinsäure; wohl aber zeigte der Harn am Versuchstage entweder eine etwas dunklere Farbe, oder doch die Eigenschaft, daß er langsam nachdunkelte. Bei subcutaner Zufuhr von Homogentisinsäure zeigte der Harn diese Eigenschaften gewöhnlich in der Portion, die 1—2 Stunden nach der Injektion von 1 g Homogentisinsäure gelassen wurde. Da solche Harne auch nach Einengen keine der übrigen Homogentisinsäure-Reaktionen gaben, so steht dahin, ob in ihnen minimalste Mengen von Homogentisinsäure ihre chromogenen Eigenschaften bedingen, oder ob es sich um irgendwelche Abkömmlinge der Homogentisinsäure handelt. Letzteres scheint uns im Hinblick auf die obenerwähnte Oxydationsskala durchaus möglich. Wir möchten deshalb solche Stoffe als Alkaptonchromogene bezeichnen. Wir verstehen darunter chromogene Substanzen im Harn, die sich nicht als Homogentisinsäure identifizieren lassen, und deren Abkunft von dieser Substanz sich ergibt, weil sie nach Verfütterung oder subcutaner Injektion von Homogentisinsäure auftreten. Da auch abseits von unseren Versuchen manche pathologischen Harne die Eigenschaft des Nachdunkelns ziemlich deutlich aufweisen, so wäre es interessant, zu ermitteln, ob in solchen Fällen die gleichen Abkömmlinge cyclischer Aminosäuren die Dunklung erzeugen. Eine Pforte zu klinischen Fragestellungen wäre geöffnet.

Von einer ganz anderen Seite kommt neuerdings M. Weiss[1]) dazu, von „Alkaptonchromogenen" zu sprechen. Er findet sie besonders in Harnen die eine positive Diazoreaktion geben. Wären diese Alkaptochromogene verwandt oder identisch mit unseren Alkaptochromogenen, so würde Wesentliches daraus zu folgern sein. Auf die Herkunft des rätselhaften Diazo-

[1]) Weiss, diese Zeitschr. **102**, 222f. 1920.

körpers würde Licht fallen u. a. m. — Diese Verwandtschaft oder Identität besteht nicht, wie wir im folgenden zeigen. Sie war von vornherein nicht sehr wahrscheinlich, weil der Alkaptonharn keine positive Diazoprobe gibt. Die Anwendung, die Weiss dem Wort Alkaptonchromogene verleiht, erscheint uns deshalb unzweckmäßig. Wir möchten diesen Ausdruck vorbehalten für solche Chromogene, deren Verwandtschaft mit Alkaptonstoff, id est Homogentinsäure, erwiesen oder wahrscheinlich gemacht wird. Hierfür genügt nicht das bloße Nachdunkeln bei alkalischer Reaktion und die Fähigkeit Silber in alkalischer Lösung zu reduzieren. Es würde zu weit führen, wollten wir hier ausführlicher über die umfangreichen Studien über Harnfarbstoffe von M. Weiss referieren. Wir verweisen auf seine Originalarbeiten[1]). Weiss versucht, in das verwickelte und schwierige Kapitel der Harnfarbstoffe Licht hineinzutragen, indem er zu deren Analyse verschiedene Fraktionen herstellt. So wird durch Fällung mit neutralem Bleiacetat als Niederschlag eine „erste Fraktion" erhalten, die vorwiegend die roten oder Urobilinfarbstoffe enthält. Aus dem Filtrat wird die hier interessierende „Fraktion II" oder Fraktion der gelben oder Urochromfarbstoffe erhalten. Wird das Filtrat der Fraktion I tropfenweise mit 10proz. Lauge versetzt, so fällt ein Niederschlag von Bleihydroxyd aus, der die Gruppe der gelben Farbstoffe mitreißen soll. Diese Fraktion zeigt ein langsames aber deutliches Nachdunkeln. Bei diazopositiven Harnen gibt sie folgende Reaktionen, die Weiss an Alkaptonfarbstoffe denken lassen: 1. Positive Ehrlichsche Diazoprobe; 2. positive Permanganatprobe nach Weiss[2]); 3. ammoniakalische Silberlösung wird innerhalb von 24 Stunden reduziert; die Verzögerung der Reaktion wird als charakteristisch angegeben; 4. bei Zusatz von etwas Ammoniak tritt intensive Grünfärbung auf, nach 24 Stunden braune Färbung. 5. Bei Überschichtung mit NH_4OH tritt nach 24 Stunden ein brauner Ring auf. Weiss resümiert: „Das mit der Ehrlichschen Diazoreaktion ursächlich in Beziehung stehende Urochromogen ist auch ein Alkaptonchromogen und enthält eine sich bei längerem Stehen unter starkem Nachdunkeln abspaltende melaninartige Gruppe, die als Phenolderivat angesehen wird und die Permanganatprobe bewirkt. Die letztere ist eine Alkaptonreaktion." Weiss bezeichnet als Alkaptonchromogene Stoffe, die auf Alkalizusatz sich braun färben und langsam Silber reduzieren und betont dabei die Beziehung dieser Stoffe zur Diazoreaktion und zur Permanganatprobe.

Allein schon die zunehmende klinische Verwendung der Parmanganatprobe ist Anlaß genug, ihre Beziehungen zu sicheren Alkaptonkörpern zu prüfen. Es erscheint uns irreführend, eine Reaktion als „Alkaptonreaktion" zu bezeichnen, obwohl sichere Alkaptonsubstanzen sie nicht geben. Folgende Versuche zeigen dies:

[1]) l. c. und diese Zeitschr. **81**, 341/42. 1917.

[2]) Med. Klin. **42**. 1910 und Münch. med. Wochenschr. **25**. 1911.

I. Reine 1%ige Homogentisinsäure-Lösung[1]).

Alkaptonreaktionen		Urochromogenreaktionen
Nachdunkeln auf Alkalizusatz	+	Diazoprobe } negativ.
Sofortige Ag-Reduktion . . .	+	$KMnO_4$-Probe }
Millonsche Probe	+	Grünfärbung nach NH_4OH-Zusatz
$FeCl_3$-Probe	+	
Kalkprobe	+	

Reine Homogentisinsäure verhält sich also durchaus anders als das Urochromogen nach Weiss, bleiben zu prüfen die im Alkaptonurin allenfalls vorhandenen chromogenen Abkömmlinge.

II. Alkaptonurin.

Es muß von vornherein betont werden, daß bei einer nicht geringen Konzentration (über 0,3%) an Homogentisinsäure die Herstellung der Fraktion II nach Weiss, wobei eine vorhergehende Pb-Fällung der übrigen Farbstoffe verlangt wird, auf große Schwierigkeiten stößt. Zwar ist die H.-S. durch Pb-Acetat fast quantitativ fällbar, doch genügt die auch nach wiederholter Bleifällung zurückbleibende Menge, um jede weitere Verarbeitung illusorisch zu machen. Erst als die H.-S.-Ausscheidung unseres kindlichen Alkaptonurikers aus anderen Gründen auf ein niedrigeres Niveau gebracht wurde, ließ sich die Fraktionierung ohne Schwierigkeiten ausführen.

Alkaptonurin:

Menge 1140 ccm, Reaktion sauer, spez. Gewicht 1014, Farbe braun.

Nativ:

Alkaptonreaktionen	Urochromogenreaktionen
Alle H.-Reaktionen	Diazo } negativ
Gehalt an H: 0,25%	$KMnO_4$ }
	Grünfärbung auf Ammoniakzusatz

Herstellung der Urochromogenfraktion (Fraktion II).

Fr. I (Pb-Acetatfällung) + Fr. II (Herbeiführung eines $Pb(OH)_2$-Niederschlages durch tropfenweisen Zusatz von 10 proz. NaOH in derselben Urinportion.

Filtrat: Farblos, wasserklar, nach 20 Minuten beginnende rötlichbraune Färbung von der Oberfläche ausgehend.

Niederschlag (Fr. I + II): Gelblichbraun, während der Entbleiung mit Na_3PO_4 tritt allmählich eine rotbraune bis dunkelrote Färbung auf. Die entbleite und filtrierte Flüssigkeit ist tiefrot. Durch Aussalzen mit Ammonsulfat wird die Fr. I entfernt. Schwachsaure Reaktion (5 proz. H_2SO_4) bleibt erhalten. Das Filtrat ist abgeblaßt, die dunkelrote Farbe kehrt aber bald zurück.

[1]) Die Homogentisinsäure stammt von dem in der Münch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 48 beschriebenen Alkaptonuriker, der Katsch zu verschiedenen Stoffwechseluntersuchungen gedient hat (Dtsch. Arch. f. klin. Med. 127 u. 134).

Diazo
$KMnO_4$ } negativ.

Ag-Reduktion erst nach längerer Zeit (ca. $^1/_2$ Stunde) gering.

NaOH-Zusatz allmählich einsetzende schwache Nachdunklung an der Oberfläche beginnend, die Nachdunklung erreicht nicht einmal nach 2 mal 24 Stunden den Boden des Reagensglases.

NH_4OH-Zusatz Andeutung einer Grünfärbung.

Spontan kein Nachdunkeln.

$FeCl_3$ negativ.

Somit gehen die nach Ausfall der H. vorhandenen Chromogene nur in ganz geringen Mengen in die Fr. II über. Vorhandensein von unveränderter H. ist nach den stattgehabten Operationen nicht mehr anzunehmen. Die vorhandenen Chromogene geben keine Diazo- bzw. keine $KMnO_4$-Reaktion.

III. Urine mit Homogentisinsäure-Abkömmlingen.

(Alkaptonchromogene.)

Die unter dieser Rubrik geführten Urine stammen von Nichtalkaptonurikern, denen H. in Mengen von 1,0—4,0 g teilweise per os, teilweise parenteral zugeführt wurde.

Fall 1: G., rachitische Kyphoskoliose.

1,0 g H. in 50 ccm Aq. dest. intramuskulär.

Urin nativ, Farbe braun, Reaktion sauer, schwach nachgedunkelt.

Ag-Reduktion
Diazo
$KMnO_4$ } negativ.

Fr. II in der vorher beschriebenen Weise hergestellt.

Farbe: Gelblichbraun
Diazoprobe
Permanganatprobe
Ag-Reduktion (auch nach 24 Stunden)
NH_4OH: Keine Grünfärbung. } negativ.

Die geringen Mengen von Chromogenen — ohne Spuren von H. — zeigen im nativen Urin geringe Nachdunklung, die sich in der Fraktionierung verliert.

Fall 2: Derselbe Pat.

4,0 g H. per os.

Urin: Nativ.

Farbe: Braun. Reaktion sauer, kaum nachgedunkelt.

Ag-Reduktion: Nach einigen Minuten deutlich.

$FeCl_3$ θ
Diazo
$KMnO_4$ θ } θ.

Fr. II.

Farbe: Braun.

$KMnO_4$
Diazo } θ.

Ag-Redukt. erst nach $^1/_2$ Stunde kaum merklich.

Nachdunkeln (Alkali) kaum merklich.

Fall 3. Pat. N. Sklerodermie.

4,0 g H per os.

Urin: Menge 940 ccm, Reaktion sauer. Nativ.

Farbe: Gelbbraun, nachgedunkelt.

Ag-Reduktion nach einigen Minuten, schwach.

$FeCl_3$, Diazo, $KMnO_4$ } θ.

Ammoniakzusatz: Deutliche Grünfärbung.

Alkalizusatz: Leichte Braunfärbung (v. d. Oberfläche ausgehend).

Fr. II.

Farbe: Braun.

Ag-Redukt. nach 3 Stunden geringfügig.

$KMnO_4$, Diazo, $FeCl_3$ } θ.

Ammoniakzusatz: Ganz schwache Grünfärbung.

Alkalizusatz: Schwache Braunfärbung.

Auch bei größeren Mengen „alkaptonchromogener" Substanzen nimmt deren Menge, gemessen an der Intensität der in Betracht kommenden Reaktionen in der Fr. II erheblich ab.

Eine für das Urochromogen charakteristische Reaktion — außer der Grünfärbung auf Ammoniak — konnte nicht gefunden werden. Auch das relativ frühzeitige Auftreten der Ag-Reduktion (auch bei dem geringsten Grade) zeigt nicht den Urochromogen- wohl aber mehr Alkaptonchromogencharakter der betreffenden Substanz.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine neue Homogentisinsäurereaktion beschrieben: Abdunstender Äther beeinflußt den Oxydationsablauf, so daß eine flüchtige Blaufärbung entsteht: Alkaptocyanreaktion.

2. Nach Fütterung oder parenteraler Zufuhr von Homogentisinsäure enthält bei manchen Individuen der Harn Substanzen, die ein Nachdunkeln bewirken, ohne daß Homogentisinsäure nachweisbar ist. Wir nennen sie Alkaptonchromogene und beschränken diese Bezeichnung auf Stoffe, die Abkömmlinge der Homogentisinsäure sind.

3. Weder Harn, der solche Alkaptonchromogene enthält, noch Alkaptonharn, noch die aus beiden nach Weiss hergestellten zweiten Farbstoffraktionen geben die Diazoprobe oder die Permanganatprobe (ebenso verhält sich reine Homogentisinsäurelösung). Demnach können die Alkaptonchromogene zu dem Weissschen Urochromogen nicht in Beziehung gebracht werden. Die Permanganatprobe ist keine Alkaptonreaktion.

Über eine neue Funktion des tryptischen Fermentes (Anhydrase) und über die Darstellung von d-Tyrosinanhydrid und d-Tryptophananhydrid aus den tryptischen Verdauungsprodukten.

Von

Sigmund Fränkel und **Emil Feldsberg.**

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 11. Mai 1921.)

Wenn man Eiweißkörper mit Pankreatin, bezw. mit möglichst rein dargestelltem Trypsin, verdaut, bemerkt man nach einigen Tagen auf Zusatz von Bromwasser, wie zuerst Nencki[1]) beobachtet hat, das Auftreten einer Violettfärbung. Diese Reaktion ist charakteristisch für das Vorhandensein von freiem Tryptophan. Die Farbenintensität nimmt im Verlauf der Verdauung in der nächsten Zeit zu, bis nach einigen Tagen ein Maximum erreicht ist.

Aus dieser Lösung kann man nach der üblichen Methode von Hopkins und Cole[2]) und ihren verbesserten Modifikationen von C. Neuberg[3]), Allers[4]) und E. Abderhalden und Kempe[5]) fast quantitativ reines Tryptophan erhalten. In allen Vorschriften der Darstellung von Tryptophan ist aus der Erfahrung angegeben, man möge die Verdauung auf der Höhe der Bromreaktion unterbrechen und das abgespaltene Tryptophan aus schwefelsaurer Lösung mit Quecksilberoxydsulfat herausfällen.

Lassen wir nun die Verdauung weitergehen, so bemerken wir ein von Tag zu Tag fortschreitendes Abklingen der Reaktion mit Bromwasser bis schließlich das Auftreten der Violettfärbung völlig

[1]) M. Nencki, Ber. **28**, 560—567. 1895.

[2]) Hopkins und Cole, Journ. of physiol. **27**, 418—428.

[3]) C. Neuberg, Charité-Annalen **30**, 424—426.

[4]) Rud. Allers, diese Zeitschr. **6**, 273. 1907.

[5]) E. Abderhalden und Kempe, Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**, 207. 1907.

verschwunden ist. Dieses auffällige Verhalten, das Verschwinden einer Aminosäure im Verlaufe der Verdauung, einer Aminosäure, die ja durch die Verdauung aus dem Eiweiß herausgespalten wurde, ließe sich theoretisch dadurch erklären, daß entweder das spaltende Ferment späterhin eine aufbauende Reaktion durchführt, eine Reaktion, in der Aminosäuren unter Wasserabspaltung säureamidartig gekuppelt werde (Rücksynthese) oder daß ein weiterer Abbau der Aminosäure stattfindet unter Abspaltung einer Karboxylgruppe unter Bildung eines proteinogenen Amins oder schließlich durch Bildung von Anhydriden der Aminosäure, die wieder in verschiedenen Formen auftreten können. Es können sich 2 Aminosäuren zu einem Dipeptid unter Austritt von einem Mol. Wasser vereinigen, beispielsweise zum Tryptophyltryptophan-R · CH · (NH_2) CO · NH RCH · COOH, was Fall 1 entspricht oder 2 Aminosäuren unter Austritt von einem Mol. Wasser zu Anhydrid von der Form $\begin{matrix} RCH \cdot CO \\ NH_2 \end{matrix} > O$ oder daß sich wieder 2 Aminosäuren unter Austritt von 2 Mol. Wasser zu einem Diketopiperazin $\begin{matrix} NH \\ OC \diagup\diagdown CHR \\ RHC \diagdown\diagup CO \\ NH \end{matrix}$ verbinden. Es könnte also entweder Tryptophan mit Tryptophan selbst oder mit einer anderen Aminosäure reagieren. Diese Überlegungen leiteten uns bei der Lösung dieser Frage. Es war also von vornherein wahrscheinlich, daß das Pankreatin oder ein dieses begleitendes Ferment eine neue Funktion entwickelte, eine Funktion, die nach der Richtung hin läuft, daß aus den gebildeten Aminosäuren Kondensationsprodukte unter Wasserabspaltung oder Basen unter Kohlensäureabspaltung entstehen.

Wir sind nun in der Weise vorgegangen, daß wir das tryptophanreiche Casein in Gegenwart von Soda mit Toluol und Chloroform als Konservierungsmittel mit Trypsin verdauten und solange im Thermostaten stehen ließen, bis die Bromwasserreaktion verschwunden war; sicherheitshalber ließen wir noch einige Tage stehen und arbeiteten die Lösung in gleicher Weise auf, wie es sonst bei der Darstellung von Tryptophan geschieht. Es zeigte sich nämlich beim Vorversuch, daß das Hopkinssche Reagens ebenso wie Tryptophan selbst den neugebildeten Körper aus der Verdauungslösung ausfällt, da die Quecksilberfällung, nicht aber die Lösung die Tryptophanreaktion mit Glyoxylsäure, nicht aber

mit Bromwasser gab. Wir erhielten die im experimentellen Teil beschriebene Verbindung $C_{22}\ H_{22}\ N_4\ O_3 + 2^1/_2\ H_2O$, die die Reaktion auf Tryptophan von Adamkiewicz und Hopkins[1]) zeigte. Man fügt zu der zu untersuchenden Lösung 2 Tropfen Glyoxylsäure und unterschichtet mit konzentrierter Schwefelsäure und kann an der Schichtungszone eine rotviolette Farbenreaktion wahrnehmen.

Da der Körper die Bromwasserreaktion nicht gab, war er also kein Tryptophan mehr. Unsere Überlegung mußte nunmehr in der Richtung hin gehen, daß, wenn das Trypsin selbst oder ein etwa es begleitendes Ferment eine zweite bis jetzt noch unbekannte Funktion besitzt, sich diese Funktion nicht nur auf die eine Aminosäure, das Tryptophan, beschränken dürfte, sondern vielmehr auch die anderen bei der tryptischen Verdauung auftretenden Aminosäuren gleichsinnigen Veränderungen unterliegen müssen.

Daher war es wahrscheinlich, daß wir in den Mutterlaugen von der Fällung des Tryptophan nach Entfernung des überschüssigen Quecksilbers und der überschüssigen Schwefelsäure auch die Produkte der Umwandlung anderer Aminosäuren finden mußten, deren Bau vielleicht durchsichtiger sein könnte, als der der Verbindung, welche vom Tryptophan sich ableitet. Dies mußte besonders von dem so leicht darstellbaren Tyrosin gelten und wir haben auch tatsächlich nach Entfernung des Überschusses an Quecksilber und Schwefelsäure eine Verbindung, ähnlich dem Tyrosin gefunden, die zwar die Millonsche und Mörnersche Reaktion zeigte, aber mit Tyrosin nicht identisch war und deren Analyse für ein **Tyrosinanhydrid** stimmte. Tyrosinanhydride sind in der Literatur beschrieben von Graziani[2]) und E. Fischer und W. Schrauth[3]), jedoch zeigt das von uns gefundene Tyrosinanhydrid andere Eigenschaften. Graziani beschreibt nämlich 2 Tyrosinanhydride, erstens ein krystallisiertes, das sich bei 260° bräunte und bei 278—279° schmilzt und aus heißem abs. Alkohol umkrystallisiert wurde, zweitens ein amorphes, das sich bei 270° zu bräunen beginnt und bei 279° schmilzt. Er erhielt die Anhydride, indem er Tyrosin mit Glycerin auf 180—190° erhitzte und das Produkt mit absolutem Alkohol auszog. E. Fischer schildert 3 verschiedene Tyrosinanhydride; das eine l-Tyrosinanhydrid, F = 277—280°,

[1]) Hopkins, Proc. of the roy. soc. **68**, 21—23.

[2]) Graziani, Atti. d. R. Accad. dei lincei Roma **5**. 24. 1, 936.

[3]) E. Fischer und W. Schrauth, Liebigs Ann. d. Chem. **354**, 21—38.

drehte in $^n/_1$-Natronlauge gelöst $-223{,}8°$, das zweite inaktive hatte $F = 300°$, das dritte Tyrosyltyrosin war in Wasser sehr leicht löslich. Die Anhydride hat E. Fischer aus dem l-Tyrosinmethylester beim Erhitzen der methylalkoholischen Lösung auf 100°, ergiebiger jedoch auf 110—120° erhalten. Unser Tyrosinanhydrid $F = 273°$ dreht rechts, ist amorph, jedoch weder in Alkohol noch in Wasser leicht löslich, so daß es sich durch die markantesten Eigenschaften, Schmelzpunkt, Krystallisation und optische Aktivität von den bereits bekannten Anhydriden unterscheidet.

Da wir nun ein Tyrosinanhydrid vor uns hatten, waren wieder drei Möglichkeiten gegeben, entweder war es ein Tyrosyltyrosin oder ein Tyrosindiketopiperazin oder gar ein Anhydrid, in welchem die zwei Karboxylgruppen zweier Tyrosinmolekule unter Abspaltung von einem Mol. Wasser reagiert hatten. Im ersten und dritten Fall tritt ein Mol. Wasser aus, beim Diketopiperazin jedoch zwei Mol. Wasser, was sich bei der Analyse bemerkbar machen mußte. Ferner mußten im ersten Fall eine freie Aminogruppe, im zweiten keine freie, im dritten zwei freie Aminogruppen vorhanden sein. Die Auswertung der Aminogruppen nach van Slyke[1]) mußte nun Gewißheit geben, ob die gefundene neue Verbindung dem Fall I, II oder III entspricht. Wir machten also die Aminogruppenbestimmung nach van Slyke und diese ergab die Gegenwart von zwei freien Aminogruppen, so daß zwei Aminosäuren unter Austritt eines Mol. Wasser zu einem Anhydrid von der Form $\begin{matrix}RCO\\RCO\end{matrix}\!\!>\!O$ sich vereinigt hatten. Es war nun die große Wahrscheinlichkeit, daß ebenso wie beim Tyrosin, so auch beim Tryptophan zwei Moleküle zusammengetreten waren unter Austritt von einem Molekül Wasser. Wir haben auch in der Tat gefunden, daß ebenso wie das Tyrosinanhydrid auch das Tryptophananhydrid entsteht (Form III), wenn man die Verdauung bis zum Verschwinden der Bromreaktion führt. Zur Verstärkung der Beweisführung haben wir durch die Sörensensche Formoltitration bewiesen, daß in beiden Körpern keine freien Karboxylgruppen vorhanden sind.

Wir haben also an zwei Aminosäuren gezeigt, daß bei der prolongierten tryptischen Verdauung Anhydridbildung vor sich geht und dadurch eine neue Funktion des tryptischen Fermentes

[1]) Van Slyke, Journ. of biol. chem. **9**, 185. 1911.

gefunden, die dahin geht zu anhydridisieren, während die bekannte Funktion des Trypsins darin besteht, säureamidartige Bindungen zu spalten. Es ist auch auffallend und interessant, daß wir bis jetzt die Bildung von gemischten Anhydriden nicht nachweisen konnten und es ist also eine spezifische Einstellung des Fermentes auf zwei gleiche Aminosäuren zu sehen, wobei unter Austritt von einem Mol. Wasser ein Anhydrid $\begin{matrix}RCO\\RCO\end{matrix}\!\!>\!O$ gebildet wird.

Wir haben auch rein dargestelltes Tryptophan mit demselben Pankreatin in 0,8 proz. Sodalösung in Thermostaten verdaut, um zu sehen, ob auch jetzt die Funktion der Fermentes die gleiche ist, wie wir sie bei der Verdauung von Casein gesehen haben. Da wir unter den gleichen Bedingungen wie Casein auch das reine Tryptophan behandelten, so erwarteten wir gleichfalls eine Abnahme der Farbenintensität bei der Bromwasserreaktion. Der Versuch blieb 50 Tage im Thermostaten stehen, doch konnten wir auch nach dieser so langen Zeit keine Veränderung bei Überprüfung mit Bromwasser wahrnehmen. Da also keine Veränderung aufgetreten war, so war es klar, daß Trypsin unter diesen Versuchsbedingungen keine anhydridisierende Wirkung zeigt, was vielleicht von dem Milieu abhängig sein dürfte. Es werden nun in unserem Laboratorium Versuche gemacht in der Verdauungslösung des Caseins die noch unbekannten Anhydride anderer Aminosäuren zu finden.

Auffällig bei der Bildung der Anhydride ist, daß wir in beiden Fällen (Tyrosin und Tryptophan) rechtsdrehende Produkte erhalten haben. Eine Erklärung hierfür hoffen wir bei weiterem Studium zu finden.

Bei Betrachtung der Fermentspaltung von Glykosiden wurde die Erfahrung gemacht, daß die Fermente, welche die α-Reihe der Glykoside aufspalten, nicht diese aber die β-Reihe aufbauen können und umgekehrt die die β-Reihe der Glykoside spaltenden Fermente die α-Reihe aufbauen. Hier sehen wir ein, daß ein Ferment, welches die Säureamidbindung hydrolysiert, die Anhydridbildung an den Carboxylgruppen durchführt, nicht aber die Kuppelung von Carboxyl- und Aminogruppen.

Experimenteller Teil.

500 g reines dänisches Caseinnatrium wurden mit 5 l 0,8 proz. Sodalösung aufgeschwemmt und mit 2 g Pankreatin gut durch-

gerührt und bei 37° im Thermostaten stehen gelassen, nachdem vorher, um Fäulnis zu vermeiden, mit Toluol überschichtet wurde. Nach 5 Tagen wurden einige Tropfen der Verdauungslösung mit Essigsäure angesäuert und mit Bromwasser versetzt, um durch die auftretende Violettfärbung den Verlauf der Verdauung zu prüfen. Diese Reaktion wurde jeden zweiten Tag angestellt, wobei sich eine stetige Zunahme in der Farbenintensität zeigte. Das Maximum derselben war am elften Tage erreicht. Nun wurde nicht wie bisher die Verdauung unterbrochen, sondern weitergeführt und nach wenigen Tagen beobachteten wir schon, daß die Reaktion mit Bromwasser an Farbenintensität abnahm. Die Farbe wurde immer blasser und nach 45 Tagen war die Reaktion vollständig verschwunden. Nun erst wurde die Verdauung unterbrochen und diese weiter verarbeitet.

Das Alkali der Lösung wurde mit konzentrierter Schwefelsäure neutralisiert, dann noch 5 Volumprozent Schwefelsäure unter Kühlung hinzugefügt. Es schied sich ein grober, flockiger Niederschlag ab, der filtriert und mehrere Male mit verdünnter Schwefelsäure nachgewaschen wurde. Diese Fällung gab keine Tryptophanreaktion. Das Filtrat wurde mit 10 proz. Quecksilbersulfatlösung in 5 volumprozentiger Schwefelsäure versetzt und stehen gelassen. Bald trübte sich die Lösung und nach 24 Stunden hatte sich ein gelber, voluminöser Niederschlag auf dem Boden des Glases abgesetzt. Es wurde mehrmals das obenerwähnte Quecksilberreagens hinzugefügt, bis die darüber stehende Flüssigkeit sich mit dem Reagens neuerlich versetzt, nicht mehr trübte und überdies nicht mehr die Adamkiewicz-Reaktion zeigte. Jetzt wurde blank filtriert und gut nachgewaschen.

d-Tyrosinanhydrid.

Das Filtrat wurde nun durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und von dem ausgeschiedenen Sulfid filtriert. Hernach wurde mit Calciumkarbonat neutralisiert und das ausfallende Calciumsulfat durch Filtrieren entfernt. Jetzt wurde die klare Lösung im Vacuum eingeengt und von dem sich immer wieder ausscheidenden Calciumsulfat filtriert. Als die Lösung bis auf 300 ccm abdestilliert war, schied sich ein weißer Körper aus, der sich zum Teil als organisch erwies. Er wurde mit wenig siedendem Wasser ausgeholt und aus diesem schied sich ein rein organischer und stickstoffhaltiger Körper ab. Dieser wurde mehrere Male aus

heißem Wasser umkrystallisiert, bis sein Schmelzpunkt konstant bei 273° blieb (Block Maquenne). Dieser Körper färbte sich beim Kochen mit Millonschem Reagens rot, was auf ein monohydroxyliertes Benzolderivat hinweist. Die Analysen dieses Körpers gaben uns bald Aufklärung über dessen Konstitution. Die Substanz wurde im Vakuum über Schwefelsäure zur Konstanz getrocknet.

2,406 mg Substanz: 0,171 ccm N (17°, 756 mm)
4,051 „ „ 0,290 „ N (16°, 765 mm)
3,482 „ „ 7,987 mg CO_2, 1,874 mg H_2O
5,123 „ „ 11,76 „ CO_2, 2,811 „ H_2O

Ber.: Für $C_{18}H_{20}N_2O_5$
C: 62,95%, H: 5,81%, N: 8,14%,
Gef.: C: 62,57%, 62,62%, H: 6,12%, 6,09%, N: 8,32%, 8,40%

Es war nun die Möglichkeit gegeben, daß 2 Tyrosinmoleküle unter Austritt von Wasser sich vereinigt hatten. Dies konnte auf zwei Arten geschehen. Entweder unter imidartiger Bindung als ein Tyrosyltyrosin oder als Anhydrid $\begin{matrix}RCO\\RCO\end{matrix}\!\!>\!O$ ebenfalls unter Austritt eines Mol. Wasser. Um nun dies feststellen zu können, wurden nach van Slyke die freien Aminogruppen bestimmt, um zu erfahren, ob es ein Dipeptid oder ein Anhydrid des Tyrosin war, das wir vor uns hatten.

Bestimmung der Aminogruppen.

0,0975 g wurden in 30 ccm 10proz. Salzsäure gelöst und hiervon 10 ccm zur Bestimmung verwendet, was also dem dritten Teil der gelösten Substanz, d. i. 0,0325 g entspricht. Diese ergaben 4,6 ccm Stickstoff (17°, 753 mm). Da jedoch nur die Hälfte des Volumens an Stickstoff von den Aminogruppen des Tyrosins stammt, die andere vom Nitritstickstoff, so zeigt die Bestimmung:

Ber.: Für 2 NH_2-Gruppen 8,14% N,
Gef.: „ 2 NH_2-Gruppen 8,25% N.

Daraus war es nun klar, daß bei unserer Substanz der ganze Stickstoff in Form freier Aminogruppen vorhanden war, wir also kein säureamidartig gebundenes Dipeptid, sondern ein Tyrosinanhydrid vor uns hatten. Zur Bestätigung wurde noch die Sörrensensche Formoltitration vorgenommen, da man genau so wie nach van Slyke, nach Sörrensen die Aminogruppen bestimmen kann.

Formoltitration.

Als Vergleichslösung wurde 0,0211 g reines Tyrosin eingewogen und dieses in 5,8 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure gelöst und mit 10 ccm der vorher bereiteten Formaldehydlösung versetzt. Es wurden zum Zurücktitrieren 8 ccm

$^n/_{10}$-Natronlauge verwendet, mehr also, als der zum Lösen bestimmten Salzsäure entspricht, da ja das Tyrosin als Säure selbst Natronlauge verbrauchte. 0,0211 g Tyrosin entsprechen 1,15 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge und wir hatten 1,2 ccm $^n/_{10}$-Lauge benötigt, um diese Menge Tyrosin zu neutralisieren.

Ber.: Für 0,0211 g Tyrosin 1,15 ccm $^n/_{10}$-Lauge,
Gef.: „ 0,0211 „ „ 1,2 „ $^n/_{10}$-Lauge.

Von unserem Tyrosinanhydrid wurden 0,0212 g eingewogen und diese in 34,99 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure gelöst und wieder mit 10 ccm der gleichen Formaldehydlösung versetzt und nun mit $^n/_{10}$-Natronlauge titriert. Es wurden 35 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge verbraucht, was genau der verwendeten Menge Salzsäure entspricht. Es war also hiermit ein weiterer Beweis erbracht worden, daß die Substanz im Gegensatz zu Tyrosin keine freien Carboxylgruppen enthält.

Unser Tyrosinanhydrid erwies sich ferner als optisch aktiv und wurden einmal die Bestimmungen in Lauge, einmal in Salzsäure gemacht. Es erwies sich auffällig, daß wir ein rechtsdrehendes Tyrosinanhydrid haben, während sonst gewöhnlich l-Tyrosin erhalten wird.

Optische Aktivität in alkalischer Lösung. (Mikropolarisation nach E. Fischer.)

5,430 mg Substanz in 2619,58 mg KOH (d = 1,54) drehten 0,12° rechts bei 13° C. $(\alpha)_D^{13} = + 37{,}59°$.

Optische Aktivität in saurer Lösung.

5,455 mg Substanz in 1792,96 mg Salzsäure (d = 1,05) drehten 0,03° rechts bei 14° C. $(\alpha)_D^{14} = + 93{,}87°$.

d-Tryptophananhydrid.

Gleichzeitig wurde der durch das Quecksilberreagens erhaltene Niederschlag weiterverarbeitet. Dieser zeigte in äußerst starkem Maße die Adamkiewicz-Reaktion. Die Fällung wurde in ein dickwandiges Becherglas gespült und daselbst mit ausgekochtem, gut gewaschenem Bariumkarbonatschlamm neutralisiert und nachher im Schwefelwasserstoffstrom zersetzt; vom Quecksilbersulfid und Bariumsulfat wurde abfiltriert und öfters nachgewaschen, bis das Waschwasser keine Adamkiewicz-Reaktion zeigte. Nun wurde das Sulfid abermals mit Wasser angerieben und nochmals 24 Stunden mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vereinigten Filtrate von den Sulfiden wurden nun mittels Durchleiten von Kohlensäure vom Schwefelwasserstoff befreit. Die klare Lösung wurde

im Vakuum im Wasserstoffstrom bis auf die Hälfte eingeengt. Die Lösung trübte sich und beim Erkalten schied sich ein voluminöser Niederschlag ab, der sich aber nach vielem Auswaschen als rein anorganisch erwies. Das Filtrat von diesem Körper wurde in gleicher Weise, wie oben beschrieben, weiter destilliert und schied noch mehrere Male Bariumkarbonat ab.

Nachdem die Lösung bis auf 100 ccm eingeengt war, versetzten wir sie mit Alkohol; sofort schied sich ein Körper aus, der trotz öfterem Nachwaschen die Adamkiewicz-Reaktion zeigte. Da jedoch dieser Körper schon beim Filtrieren verharzte, wurde er mit Methylalkohol angerieben, mit diesem überschichtet und ins Vacuum gebracht, wo er allmählich fest wurde. Das Filtrat von diesem Körper wurde immer wieder unter erneutem Zusatz von Äthylalkohol eingeengt und als die Lösung hochprozentig alkoholisch war, mit Äther versetzt. Wir erhielten wieder einen schmierigen, verharzenden Körper, der gleichfalls die Adamkiewicz-Reaktion gab. Das Filtrat von diesem Körper wurde bis zur sirupösen Konsistenz eingeengt und im absoluten Vakuum getrocknet. Alle 3 Körper zeigten gleiche Eigenschaften und wurden auch als gleich erkannt. Wir versuchten nun den Körper umzukrystallisieren, was jedoch ganz ohne Erfolg war, da er sich bloß in verdünntem Alkohol löste, doch aus diesem nicht krystallisierte. Er war bariumhaltig und wasserlöslich. Da wir keine übereinstimmenden Analysenresultate erhielten, versuchten wir den Körper auf folgende Art zu reinigen.

Wir lösten ihn in Wasser und fällten das Barium mit Schwefelsäure als Bariumsulfat und machten außerdem die Lösung mit Schwefelsäure sauer, und fällten wieder mit dem bekannten Quecksilberreagens. Zuerst wurden einige Tropfen hinzugefügt, bis eine schwache Trübung entstand und rasch filtriert und dann fraktioniert gefällt, ein Vorgang, der auch bei der Reinigung des Tryptophans praktisch benützt wird. Jetzt erst wurde mit dem Quecksilbersulfat solange versetzt bis die klare überstehende Flüssigkeit nicht mehr die Adamkiewicz-Reaktion zeigte. Der Niederschlag wurde abfiltriert und so wie früher, aber diesmal ohne Zusatz von Bariumkarbonat, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und von dem ausgeschiedenen Sulfid durch Filtration befreit. Bevor wir nun einengten, vertrieben wir durch Kohlensäure den Schwefelwasserstoff, stumpften die Schwefelsäure mit Bleikarbonat ab und filtrierten vom ausgefallenen Bleisulfat.

Die Lösung wurde im Wasserstoffstrom im Vacuum destilliert und bei 300 ccm mit Alkohol versetzt, um die letzten Spuren von Bleisulfat zu entfernen. Nachdem dies geschehen war, wurde immer wieder mit Alkohol versetzt und abdestilliert und dies so oft, bis die Lösung hochprozentig alkoholisch war. Es wurde nun unter starker Kühlung die Lösung stehen gelassen, doch krystallisierte nichts aus. Erst auf Zusatz von Aceton bildete sich ein Niederschlag, der wie die früheren verharzte, doch neuerlich mit Aceton überschichtet, fest wurde. Dieser Körper wurde mehreremals in verdünntem Alkohol gelöst und mit Aceton gefällt, bis der Zersetzungspunkt 230—245° konstant blieb und die bisher anhaftende anorganische Verunreinigung verschwunden war. Nach längerem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure ergab die Verbindung folgende Analysenresultate:

3,145 mg Substanz 0,339 ccm N (16°, 755 mm)
5,106 „ „ 0,559 „ N (17°, 756 „)
4,987 „ „ 11,06 mg CO_2, 2,631 mg H_2O
6,116 „ „ 13,54 m CO_2, 3,487 „ H_2O

Ber.: Für $C_{22}H_{32}N_4O_3 + 2^1/_2 H_2O$
C: 60,69%, H: 6,20%, N: 12,87%;
Gef.: C: 60,50%, H: 5,90%, N: 12,65%,
60,43%, 6,38%, 12,63%.

Die Substanz wurde bei 110° im Vakuum im Hans Mayerschen Apparat getrocknet und nahmen 5,145 mg Substanz um 0,504 mg, 3,567 mg Substanz um 0,359 mg an Gewicht ab.

Ber.: Für $2^1/_2$ Mol Wasser 10,34%,
Gef.: „ $2^1/_2$ „ „ 9,81%, 10,07%.

Da der Körper die Adamkiewicz-Reaktion zeigte, versuchten wir kolorimetrisch, den Gehalt an Tryptophan nach der Methode von Fasal[1]), die in unserem Institute ausgearbeitet wurde, zu bestimmen.

Colorimetrische Bestimmung.

Die Bestimmung beruht auf dem Farbenunterschied, der sich bei der Adamkiewicz-Reaktion ergibt und wurde folgendermaßen ausgeführt: Eingewogen wurden 0,0040 mg Substanz, 2 ccm Glyoxylsäurelösung hinzugefügt und mit 6 ccm konzentrierter Schwefelsäure gemischt. Die Reaktion wurde verglichen mit der Standardlösung 1GW Tryptophan in 1000 GW Wasser.

Am Colorimeter (Duboscqu) Standardlösung: 15 Teilstriche,
Substanzlösung: 55,35 „

[1]) Fasal, diese Zeitschr. **44**, 394. 1912.

folglich enthält die Substanzlösung um 3,69 mal mehr Tryptophan als die Standardlösung

$$0{,}004 : 0{,}001 = 100 : x$$
$$x = 25$$
$$25 \cdot 3{,}69 = 92{,}25\%,$$

Ber.: Für 2 Mol Tryptophan 92,37%,
Gef.: „ 2 „ „ 92,25%.

Aus den Analysen war es bis nun ersichtlich, daß unsere Verbindung aus 2 Mol Tryptophan besteht unter Austritt eines Mol. Wasser. Die bereits besprochenen Möglichkeiten suchten wir nun experimentell durch die Bestimmung nach van Slyke und Sörrensen zu bestimmen.

Aminogruppen-Bestimmung.

0,229 g in 100 ccm Wasser gelöst. Hiervon wurden 20 ccm entsprechend einem Fünftel der Einwage, d. i. 0,0458 g genommen und ergaben 5,08 ccm Stickstoff, jedoch kam nur die Hälfte in Rechnung aus bereits genannten Gründen, was also 2,54 ccm N (17°, 755 mm) ist.

Ber.: Für 2 Aminogruppen 6,43%,
Gef.: „ 2 „ 6,48%.

Daraus ist es also ersichtlich, daß wir 2 freie Aminogruppen haben und also eine säureamidartige Bindung nicht möglich ist, was noch durch die Formoltitration einwandfrei bewiesen wurde.

Formoltitration.

Zur Kontrolle wurden vorerst 0,0213 g Tryptophan in wenig Wasser gelöst und mit 10 ccm Formaldehydlösung versetzt und verbrauchten 1,2 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge, was für die freie Aminosäure spricht. Es entsprechen nämlich der eingewogenen Menge Tryptophan 1,4 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge und wir verbrauchten 1,2 ccm dieser Natronlauge.

Ber.: Für 0,0213 g Tryptophan 1,4 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge,
Gef.: „ 0,0213 „ „ 1,2 „ $^n/_{10}$-Natronlauge.

Mit dieser Vergleichslösung wurde in Einklang gebracht. Nun wurden 0,0223 g unserer Substanz, des Tryptophananhydrids, mit 10 ccm Formaldehyd versetzt, sie verbrauchten beim Titrieren nichts an $^n/_{10}$-Natronlauge, woraus es klar ist, daß die Substanz keine freie Carboxylgruppe enthält.

Durch all diese Bestimmungen ist nun einwandfrei bewiesen, daß wir es mit einem Tryptophananhydrid zu tun haben, daß nach der kolorimetrischen Bestimmung aus zwei Mol. Tryptophan besteht; ferner daß diese nicht säureamidartig miteinander verbunden sind und das keine freie Säure vorliegt. Wir haben also ein Anhydrid gefunden, daß aus 2 Mol. Aminosäure unter Austritt eines Mol. Wasser von der Form $\begin{matrix}\text{RCO}\\\text{RCO}\end{matrix}\!\!>\!\text{O}$ entstanden ist.

Unser Anhydrid erwies sich genau so wie das vorher beschriebene Tyrosinanhydrid als optisch aktiv und genau so wie dieses rechts drehend, trotzdem bisher nur linksdrehendes Tryptophan erhalten wurde.

Optische Aktivität.

10,805 mg Substanz in 2225,795 mg Wasser gelöst, drehte 0,01 rechts bei 16° C.

$$(\alpha)_D^{16} = + 20{,}59°.$$

Zusammenfassung.

Wir haben also bei der protrahierten tryptischen Verdauung zwei neue Substanzen gefunden, deren Analyse und Konstitutionsermittlung zeigt, daß das Trypsin oder ein dieses begleitendes Ferment anhydridisierend wirkt u. zw. so, daß zwei gleiche Aminosäuren mit ihren Karboxylgruppen unter Abspaltung eines Mol. Wasser sich zu einem Anhydrid von dem Schema $\begin{matrix} RCO \\ RCO \end{matrix}\!\!>\!O$ vereinigen, was dadurch bewiesen wurde, daß wir die Bestimmung der freien Aminogruppen nach van Slyke machten und daß die Sörrensensche Formoltitration auf freie Säure eine negative war. Wir haben also eine neue Funktion des Fermentes gefunden, eine spezielle Funktion, die dahin geht, gleiche Aminosäuren zu anhydridisieren, wenn die tryptische Verdauung nicht auf der Höhe der Bromreaktion unterbrochen, sondern bis zum Verschwinden derselben weiter geleitet wird. Interessant ist es ferner, daß diese Anhydrase sowohl das des l. Tyrosin, als auch das des l. Tryptophan, in d.-Tyrosinanhydrid, resp. in d.-Tryptophananhydrid verwandelt.

Über Jodabspaltung aus Jodoform und dessen Ersatzpräparaten.

Von

C. Bachem und **H. Kriens.**

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn.)

(Eingegangen am 12. Mai 1921.)

Seit der Einführung des Jodoforms in die Chirurgie durch Billroth (1880) hat sich das Mittel trotz mancher unangenehmer Eigenschaften bis auf den heutigen Tag gehalten, vor allem zur örtlichen Behandlung tuberkulöser Erkrankungen, während man zur eigentlichen Wundbehandlung seine zahlreichen Ersatzpräparate vorzieht.

Bekanntlich kommt dem Jodoform eine keimtötende Wirkung nicht als solchem zu, sondern diese soll nach Binz[1]) ihre Ursache lediglich in der Abspaltung von freiem Jod haben. Dieses Halogen wird vom Wundsekret, Eiter usw. bei längerem Kontakt langsam, aber kontinuierlich abgespalten. Jodoform in Substanz und in Lösung hat nämlich als ungespaltenes Molekül auf die Mehrzahl der Bakterien keinen oder nur einen sehr geringen Einfluß, wogegen Jod in statu nascendi bekanntlich ein sehr kräftiges Desinfektionsmittel ist. Mit dem Eiweiß der Gewebe bildet es außerdem Albuminate (Jodalbuminate), wodurch eine gewisse Adstriktion bedingt ist, die eine übermäßige Wundsekretion zu hemmen vermag.

Die in praxi gebräuchlichen Jodoformersatzpräparate, welche die unangenehmen Wirkungen der Muttersubstanz nicht oder nur

[1]) Binz, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 8, 309. 1878; Virchows Arch. 89, 389. 1882. — Die außerordentlich umfangreiche Literatur und das Ergebnis früherer uns hier interessierender Versuche über Jodoform findet sich bei Altenburg (Arch. internat. de pharmacodyn. et de thérap. 8, 125. 1901) sowie bei Schmidt (ebendort 8, 111 u. 9, 107. 1901). Der Raumersparnis wegen sei hier auf diese Ausführungen verwiesen.

sehr wenig zeigen, sind recht zahlreich. Die bekanntesten, mit denen wir uns auch im folgenden zu befassen haben, sind etwa: Jodoformogen, ein Jodeiweißpräparat; Jodoformin, Jodoform-Hexamethylentetramin; Jodofan, Monojoddioxybenzolformaldehyd; Airol, Wismutoxyjodidgallat; Aristol, Dithymoldijodid; Europhen, Isobutylorthokresoljodid; Isoform, Parajodanisol; Vioform, Jodchloroxychinolin; Jodol, Tetrajodpyrrol; Jodolen, eine Jodoleiweißverbindung; Novojodin, Hexamethylentetramindijodid.

Der Prozentgehalt an Jod ist ein recht verschiedener; indes darf man a priori nicht voraussetzen, daß solche mit hohem Jodgehalt auch therapeutisch am stärksten wirksam sind. Die Abspaltbarkeit des Jods ist nämlich von mannigfachen Faktoren abhängig und geht nicht immer parallel mit der antiseptischen Kraft des Präparates. Ehe wir uns mit der Frage der Abspaltbarkeit der einzelnen Präparate beschäftigen, sei zunächst eine kurze Betrachtung über die Wirkungsweise des Jodoforms vorangestellt.

Wie bereits angeführt, soll nach Binz die antiseptische Wirkung des Jodoforms auf einer dauernden Abspaltung von freiem Jod beruhen, dem bekanntlich eine außerordentlich hohe Desinfektionskraft zukommt. Die Ansicht, daß daneben aus dem Jodoform auch andere antiseptisch wirkenden Stoffe gebildet werden können, wenn das Mittel mit dem Organismus bezw. frischem Protoplasma in Berührung kommt, wird ebenfalls vertreten. Durch Extrahieren mit Wasser aus Organen kann man Stoffe gewinnen, denen die Fähigkeit zukommt, Jodoform unter Luftabschluß so zu zersetzen, daß sich Bakterien in den mit Jodoform versetzten Organextrakten nicht entwickeln können. Diese Wirkung führt man auf die Bildung eines stark bakteriziden Stoffes aus dem Jodoform zurück und vermutlich soll dieser Körper Dijodacetyliden sein. Einige gehen dabei so weit, daß sie die Binzsche Theorie von der Abspaltung des Jods aus Jodoform in Abrede stellen.

Eine weitere Erklärung für die Wirksamkeit des Jodoforms ist gegeben durch die allerdings geringe Löslichkeit des Mittels in Wasser; etwas höher dürfte seine Löslichkeit im Serum und anderen fett- und lipoidhaltigen Körpersäften sein. Die Löslichkeitsbedingungen sind also im Organismus andere als in vitro

und wenn auch dem unzersetzten Molekül keine besondere Wirkung zugeschrieben wird, so ist andererseits an das Verhalten anorganischer Jodverbindungen (Jodalkalien) zu erinnern, die doch auch wohl im Körper bezw. im pathologisch (luetisch, karcinomatös) veränderten Gewebe, wenn auch nur zu einem winzigen Teil, in freies Jod gespalten werden.

Bei der Prüfung der Wirkungsweise der Ersatzpräparate im Vergleich zu Jodoform ist es einerseits von Bedeutung, ob sich das Präparat in Wasser oder in den Körpersäften löst oder ob sich aus ihm eine lösliche Jodverbindung bildet, andererseits, ob eine Abspaltung von freiem Jod stattfindet.

Zweck dieser Untersuchungen war die Feststellung, ob bei Jodoform und den von uns untersuchten Ersatzpräparaten unter ähnlichen Bedingungen, wie sie bei der Anwendung im Körper gegeben sind, d. h. unter Einwirkung von Wasser, Eiweiß, Wärme und Licht — Faktoren, die bei der offenen Wundbehandlung eine Rolle spielen können — auch in vitro einerseits eine Abspaltung von Jod, andererseits eine Lösung jodhaltiger Verbindungen beobachtet werden kann. Außerdem sollte bei jedem Mittel festgestellt werden, welche von den genannten Faktoren für eine Zersetzung in jedem Falle von Bedeutung sind.

Der Nachweis des Jods wurde in der üblichen Weise mit Stärkelösung geführt. Diese Reaktion ist so empfindlich, daß sie — wie sich bei einem Vergleich mit einer Jodlösung von bekanntem Gehalt ergab — im Kubikzentimeter noch 0,0000063 g Jod anzeigt, d. h. noch eine deutliche Blaufärbung gibt. Eine solche Blaufärbung wird in den folgenden Tabellen mit + bezeichnet. Eine Jodlösung von doppelter Konzentration gibt eine viel intensivere Blaufärbung, wie sie in den Tabellen mit ++ angedeutet wird. Ein Gehalt von 0,000025 g Jod im Kubikzentimeter ergibt eine eben noch durchsichtige tiefblaue Flüssigkeit (+++). Eine im Reagenzglas undurchsichtige Lösung, die im Kubikzentimeter mindestens 0,05 mg Jod enthält, ist in den Tabellen mit ++++ bezeichnet. Durch diese verschiedenen Grade der Blaufärbung läßt sich der Gehalt der Flüssigkeit an Jod einigermaßen schätzungsweise bestimmen.

Zum Nachweis, ob eine Lösung lösliche Jodverbindungen enthält, muß das Jod bekanntlich erst durch rauchende Salpetersäure in Freiheit gesetzt werden (die rauchende Salpetersäure wurde

mit gleichen Teilen gewöhnlicher Salpetersäure verdünnt). Nachdem die zu untersuchende Flüssigkeit mit wenigen Tropfen Stärkelösung versetzt war, wurde ein Tropfen des Salpetersäuregemisches hinzugegeben. Unterblieb die Blaufärbung, so war die Flüssigkeit praktisch frei von gelösten Jodverbindungen.

Zur Prüfung der Frage, ob ein Präparat sich leicht zersetzt oder nicht, mußte festgestellt werden, ob es sich in Wasser, wenn auch nur wenig, löst oder ob es freies Jod enthält. Zu diesem Zwecke wurden von jedem Mittel 0,25 g auf ein Filter gebracht und mit je 10 ccm Wasser durchgespült (siehe Tab. I, Spalte 1). Bei der Prüfung der Filtrate auf freies Jod ergab sich lediglich bei Novojodin mit Stärkelösung eine schwache Blaufärbung. Eine stärkere Färbung konnte in dem Filtrat, auch auf Hinzufügung eines Tropfens Jodkalilösung nicht erzielt werden. Aus der Tatsache, daß die Blaufärbung mit Stärkelösung allein auftrat, muß auf gleichzeitiges Vorhandensein von Jodwasserstoffsäure oder Jodiden neben freiem Jod in der Lösung geschlossen werden, eine Annahme, die sich bestätigte, als etwas rauchende Salpetersäure zum Filtrat gesetzt wurde: es entstand jetzt im Novojodinfiltrat eine undurchsichtige blaue Trübung. Daraus ist also zu schließen, daß Novojodin im Gegensatz zu allen anderen Jodpräparaten beim Durchspülen mit Wasser freies Jod abgegeben hatte. Daneben war auch reichlich Jod in gebundenem Zustand in Lösung gegangen. Die Eigenschaft, daß sich beim Durchspülen mit Wasser eine Jodverbindung löst, teilt das Novojodin mit dem Airol. Denn nachdem die Filtrate der übrigen Jodpräparate in gleicher Weise mit Stärkelösung und Salpetersäure versetzt worden waren, trat auch beim Airol eine undurchsichtige blaue Trübung auf. Es waren also auch hier reichliche Mengen einer jodhaltigen Verbindung in Lösung gegangen. Die anderen Präparate hatten sich weder gelöst, noch Jod in Lösung gegeben. Vom rein klinischen Standpunkt wären also diese beiden Präparate wegen ihrer leichten Jodabspaltbarkeit zu bevorzugen.

Da hier nur festgestellt werden soll, ob sich aus den untersuchten Präparaten überhaupt Jod abspaltet oder in gebundener Form in Lösung geht, so braucht nicht weiter untersucht zu werden, welcher Art die gelöste Jodverbindung ist. Es ist möglich, daß sich durch die Einwirkung von Wasser allein das Präparat zersetzt, sei es auch nur nach Art einer hydrolytischen Spaltung.

Es handelt sich hier nur darum, festzustellen, ob überhaupt Jod oder jodhaltige Substanz in Lösung geht. Wenn keine Lösung einer Jodverbindung eintritt, so muß das Präparat entweder wirkungslos sein, oder es muß durch direkte Jodabspaltung wirken.

Weiterhin haben wir alle Präparate daraufhin untersucht, ob sie trotz anfänglicher Unlöslichkeit doch auf die Dauer löslich werden. Es wurde zu diesem Zwecke 0,25 g der betreffenden Substanz in 10 ccm Wasser gebracht, gut durchgeschüttelt und 3 Tage lang im Dunkeln aufbewahrt (Tab. II, Spalte 1). Dann wurden die Aufschwemmungen der Präparate filtriert und die Filtrate in 2 Teile geteilt. Zu der einen Hälfte wurde tropfenweise Stärkelösung hinzugesetzt: nur bei Novojodin trat eine Blaufärbung ein. Im Filtrat der anderen Präparate trat indes keine Blaufärbung ein, auch nicht auf Jodkaliumzusatz. Die andere Hälfte eines jeden Filtrates wurde zwecks Untersuchung auf gebundenes Jod mit wenig Stärkelösung unter Hinzufügung eines Tropfens rauchender Salpetersäure versetzt. Nun zeigte sich außer bei Novojodin und Airol auch bei Jodoformogen eine undurchsichtige Trübung; es hatten sich also von diesen 3 Präparaten erhebliche Teile gelöst. In nur geringem Grade waren auch Aristol, Europhen und Jodolen in Lösung gegangen, denn auch im Filtrat der mit diesen Substanzen angesetzten Aufschwemmungen trat eine geringe Blaufärbung mit Stärkelösung auf Salpetersäurezusatz ein.

Beachtenswert scheint bei diesem Versuch die Tatsache, daß, während die Mehrzahl der Präparate in Wasser unlöslich ist, wir beim Jodoformogen und Jodolen zu einem besonderen Resultat kommen. Betrachtet man diese beiden unter dem Gesichtspunkt ihrer Zusammensetzung (Jodoformogen = Jodoformeiweiß, Jodolen = Jodeiweiß auf der Grundlage des Jodols), so erhellt also aus diesem Versuch, daß diese Jodoform- bezw. Jodoleiweißverbindungen leichter in Wasser löslich bezw. zersetzlich sind, als die Ausgangspräparate.

Um für die späteren Versuche noch eine Vergleichsgrundlage zu bekommen, bedurfte es noch der Feststellung, ob die Präparate in dem Zustand, wie sie im Handel sind, freies Jod enthalten. Im Novojodin war bereits (s. o.) freies Jod nachgewiesen. Zur besseren Löslichkeit etwa vorhandenen Jods wurde eine wässerige

Jodkaliumlösung zum Ausschütteln benutzt. Nach Filtration der Aufschwemmung wurde das Filtrat wie üblich mit Stärkekleister geprüft; dabei erwiesen sich Novojodin und Aristol als jodhaltig. Der Gehalt an freiem Jod im Aristol war allerdings nur gering und vermutlich hatte es sich im vorigen Versuch nicht genügend gelöst, und war dem Nachweis entgangen. (Das von uns untersuchte Aristol war ein mindestens 10 Jahre altes Präparat, das vielleicht im Laufe der Zeit eine ganz geringe Zersetzung erfahren hatte.)

Anders als bei den übrigen Präparaten mußte bei der Untersuchung des Isoforms verfahren werden. Schüttelt man nämlich dieses Präparat mit Jodkalilösung, so spaltet sich aus dem Jodkalium freies Jod ab. Dieses beruht auf einer Sauerstoffentwicklung aus dem p-Jodoanisol, das sich dabei zu Jodanisol reduziert. Mit Jodkali-Stärkelösung versetzt, tritt Blaufärbung auf. Schüttelt man aber Isoform mit Chloroform, so läßt sich kein freies Jod ausschütteln, ein Beweis, daß das im vorigen Versuch mit Jodkalium-Stärkelösung nachgewiesene Jod nicht aus dem Präparat selbst, sondern aus dem Jodkalium stammt, das infolge der oxydierenden Wirkung des Isoforms zersetzt wurde.

Die folgenden Versuche sollen den Einfluß des diffusen Tageslichtes auf die Jodabspaltung zeigen. Dazu wurden 1. je 0,25 g der trockenen Substanz 3 Tage lang an diffusem Tageslicht aufbewahrt (Tab. I, Spalte 2). — 2. Die gleichen Mengen der Präparate mit je 10 ccm Wasser aufgeschwemmt und 3 Tage lang der Einwirkung des diffusen Tageslichtes ausgesetzt (Tab. II, Spalte 2). Nach Abfiltrieren der ungelösten Rückstände zeigte sich nur in dem Novojodin- und Aristolfiltrat freies Jod. Gegenüber dem Versuch mit den unbelichteten Präparaten hatte nur das Aristol eine stärkere Zersetzung durch das Tageslicht aufzuweisen.

Wurden die dem Tageslicht ausgesetzten trockenen Präparate auf dem Filter mit je 10 ccm Wasser durchgespült, so zeigte sich nur bei dem Novojodin ein Gehalt an freiem Jod. Gegenüber dem unbelichteten Prapärate war also hier kein Unterschied zu bemerken. Wurde aber zu dem Filtrat rauchende Salpetersäure hinzugesetzt, so zeigte sich, daß nicht nur Airol und Novojodin, sondern auch Jodoformin, Jodoformogen und Jodolen eine Zersetzung durch die Lichteinwirkung erfahren hatten, da in den

Tabelle I.

Reagens:	Spalte I. 0,25 g Substanz auf dem Filter mit 10 ccm Wasser durchspült, Filtrat versetzt mit: Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. Salpetersäure	Mit Jodkalilösung geschüttelt, Filtrat versetzt mit Stärkelösung	Spalte II. 0,25 g Substanz 3 Tage am diff. Tageslicht. Auf dem Filter mit 10 ccm Wasser durchspült. Filtrat versetzt mit: Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. Salpetersäure	Mit Jodkalilösung geschüttelt, Filtrat versetzt mit Stärkelösung	Spalte III. 0,25 g Substanz 3 Tage im Sonnenlicht. Auf dem Filter mit 10 ccm Wasser durchspült. Filtrat versetzt mit: Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. Salpetersäure	Mit Jodkalilösung geschüttelt, Filtrat versetzt mit Stärkelösung	Spalte IV. 0,25 g Substanz 3 Tage bei 37°. Auf dem Filter mit 10 ccm Wasser durchspült. Filtrat versetzt mit: Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. Salpetersäure	Mit Jodkalilösung geschüttelt, Filtrat versetzt mit Stärkelösung
Jodoform . .	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	++++	−	−	−	−
Jodoformogen	−	−	−	−	−	−	++++	−	−	−	++++	++++	−	−	++++	−
Jodoformin .	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	++++	++++	−	−	+	−
Novojodin .	+	+	++++	++	+	+	++++	+	−	−	++++	++++	+	+	++++	+
Jodofan . .	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
Europhen . .	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	+	−	−	−	+
Aristol . . .	−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	++++	++++	−	−	++++	−
Airol . . .	−	−	++++	−	−	−	++++	−	−	−	++++	−	−	−	++++	−
Vioform . .	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Isoform . .	−	−	−	Mit Chlorof. − statt Jodkali	−	−	−	Mit Chlorof. − statt Jodkali	−	−	−	Mit Chlorof. − statt Jodkali	−	−	−	Mit Chlorof. − statt Jodkali
Jodol . . .	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
Jodolen . .	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	++	+	−	−	−	−

entsprechenden Filtraten deutlich Jod nachzuweisen war. Unter dem Einfluß des diffusen Tageslichtes hatten also die drei letztgenannten Präparate eine Zersetzung erfahren, welche in ihrer leichteren Löslichkeit in Wasser zum Ausdruck kommt. Wurden unbelichtete Präparate auf dem Filter mit Wasser durchspült, so zeigte sich das Filtrat vollkommen frei von Jod. Nach 3tägiger Lichteinwirkung in gleicher Weise verfahren, zeigte sich im Filtrat ein deutlicher Gehalt an einer gelösten jodhaltigen Verbindung.

Beim Schütteln der dem diffusen Tageslicht ausgesetzten trockenen Präparate mit Jodkalilösung fand sich außer bei Novojodin auch bei Europhen und Aristol in geringer Menge freies Jod. Das unbelichtete Europhen hatte kein freies Jod enthalten; es hat also hier unter Lichteinwirkung eine Abspaltung von freiem Jod stattgefunden.

Die in einer Aufschwemmung mit Wasser dem Licht ausgesetzt gewesenen Präparate zeigten ebenfalls eine Änderung ihrer Löslichkeit in Wasser. In den entsprechenden Filtraten fanden sich gelöste Jodverbindungen bei Jodoform, Jodoformogen, Jodoformin, Novojodin, Europhen, Aristol, Airol und Jodolen. Bei Lichtabschluß in analoger Weise behandelt, hatte die von Jodoform und Jodoformin abfiltrierte Flüssigkeit kein Jod enthalten. Außerdem hatte sich unter dem Einfluß des Lichtes in den Filtraten von Europhen und Aristol mehr jodhaltige Substanz gelöst, als in dem unter Lichtabschluß angesetzten Versuch. Ferner hatten Novojodin und Aristol freies Jod abgespalten, während unter Lichtabschluß ja nur die mit Novojodin angesetzte Lösung freies Jod enthalten hatte. Es hatte sich also auch beim Aristol eine deutlich erkennbare Wirkung des Lichtes gezeigt.

Setzt man die uns interessierenden Präparate längere Zeit der Einwirkung des direkten Sonnenlichtes aus, so ist die Wirkung eine viel stärkere. (Tab. I, Spalte 3). Wurde von jedem der in Frage stehenden Mittel 0,25 g in einem Erlenmeyerschen Kölbchen 3 Tage lang dem Sonnenlicht ausgesetzt, so zeigte sich meist schon äußerlich eine deutliche Veränderung. Das gelb-graue Jodol war bräunlich, das gelbliche Jodolen mehr grünlich verfärbt. Isoform färbte sich gelb bis hellbraun, desgleichen das Jodoformogen und das Jodoformin. Das rehbraune Aristol war zu einem blaßgelben Pulver entfärbt, das gelbliche Europhen zeigte eine

dunkelbraune Farbe. Bei Jodoform war zwar keine Farbenänderung zu erkennen, doch war das Gefäß an der Innenwand mit kleinen blauglänzenden Jodkriställchen besetzt. Äußerlich ganz unverändert erschienen Vioform, Airol, Jodofan und Novojodin. In derselben Weise wie bei den früheren Versuchen, wurde auch jetzt die Substanz auf dem Filter mit etwas Wasser ausgewaschen und die eine Filtrathälfte mit Jodkalistärkelösung versetzt; dabei zeigte sich aber in keinem Falle freies Jod, auch nicht beim Novojodin, bei dem sonst immer freies Jod in nicht geringen Mengen nachgewiesen werden konnte. Dagegen zeigte sich in der anderen Hälfte des Filtrates, nachdem diese mit Stärkelösung und rauchender Salpeterlösung versetzt worden war, daß alle Präparate, mit Ausnahme von Vioform, Isoform und Jodofan, Jod in gebundener Form in Lösung gegeben hatten. Schüttelte man die Präparate in dem Gefäß, in dem sie der Einwirkung des Sonnenlichtes ausgesetzt waren, kurze Zeit mit Jodkalilösung, wodurch sich auch das an den Gefäßwänden etwa abgeschiedene Jod auflöste, so war nur in den Filtraten von Vioform und Airol kein freies Jod nachzuweisen. Alle anderen hatten freies Jod abgespalten. Auch aus Isoform, das wegen der Oxydationswirkung nicht mit Jodkalilösung versetzt werden durfte, gelang es mit Chloroform freies Jod auszuschütteln.

Setzten wir nun eine Aufschwemmung der Präparate mit Wasser 3 Tage lang dem direkten Sonnenlicht aus (Tab. II, Spalte 3), so zeigte sich nach der Filtration freies Jod in den Filtraten von Jodoform, Jodoformin, Novojodin, Aristol, Airol und Isoform. Bei allen diesen Präparaten trat die Blaufärbung mit Stärkelösung allein auf, ein Beweis, daß außer freiem Jod auch noch Jodide (oder Jodwasserstoffsäure) in Lösung enthalten waren. Jodhaltige Verbindungen konnten denn auch bei allen Präparaten, nicht nur bei den oben erwähnten in Lösung nachgewiesen werden.

Unsere nächste Versuchsreihe sollte entscheiden, inwieweit eine Temperatur von 37° die einzelnen Präparate zu zersetzen imstande ist.

Bei Aufbewahrung der trockenen Substanz 3 Tage lang im Brutschrank bei der genannten Temperatur (Tab. I, Spalte 4) war nach Ausspülen mit je 10 ccm Wasser nur bei Novojodin freies Jod nachzuweisen. Wurde aber das Filtrat auf gelöste

Tabelle II.

Reagens:	Spalte I. 0,25 g Substanz, 10 ccm Wasser, 3 Tage im Dunkeln, filtriert, Filtrat versetzt mit			Spalte II. 0,25 g Substanz. 10 ccm Wasser, 3 Tage im diff. Tageslicht, filtriert, Filtrat versetzt mit			Spalte III. 0,25 g Substanz, 10 ccm Wasser, 3 Tage im Sonnenlicht, filtriert, Filtrat versetzt mit			Spalte IV. 0,25 g Substanz, 10 ccm Wasser, 3 Tage bei 37° filtriert, Filtrat versetzt mit		
	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H
Jodoform . . .	–	–	–	–	–	+++	++++	++++	++++	–	–	+
Jodoformogen .	–	–	++++	–	–	++++	–	–	++++	–	–	++++
Jodoformin . .	–	–	–	–	–	++	+++	+++	++++	–	–	++
Novojodin . . .	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Jodofan	–	–	–	–	–	–	–	–	++	–	–	+
Europhen . . .	–	–	+	–	–	++	–	–	++++	++	++	++++
Aristol	–	–	+	+	+	++	+	+	++++	+	+	++++
Airol	–	–	++++	–	–	++++	+++	+++	++++	–	–	++++
Vioform	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+
Isoform	–	–	–	–	–	–	+++	+++	++++	–	–	–
Jodol	–	–	–	–	–	–	–	–	++	–	–	+
Jodolen	–	–	+	–	–	+	–	–	++++	–	–	+++

Jodverbindungen untersucht, so fanden sich solche bei Jodoformogen, Jodoformin, Novojodin und Airol; Airol und Novojodin hatten sich schon in einem früheren Versuche als teilweise löslich in Wasser erwiesen, aber bei Jodoformogen und Jodoformin konnten dabei keine Jodverbindungen im Filtrat festgestellt werden. Hier war also eine Einwirkung der erhöhten Temperatur zu bemerken. — Beim Schütteln mit Jodkalistärkelösung zeigten außer Novojodin auch Aristol und Europhen einen Gehalt an freiem Jod. Für Europhen war damit also auch eine unter Wärmeeinwirkung zustande gekommene Jodabspaltung nachgewiesen.

Wir haben dann ferner eine Aufschwemmung der Präparate mit Wasser der Brutschranktemperatur 3 Tage lang ausgesetzt (Tab. II, Spalte 4). Dabei fand sich ebenfalls freies Jod in den Filtraten von Novojodin, Europhen und Aristol. Untersuchte man auf Jod in gebundener Form, so war nur das Isoform-Filtrat frei von Jodverbindungen. Alle anderen Filtrate enthielten gelöste Jodverbindungen. Es hatte sich im ganzen eine starke Förderung der Löslichkeit der Präparate in Wasser durch die Wärme ergeben, ähnlich wie es sich nach längerer Einwirkung des Sonnenlichtes gezeigt hatte.

Um den Verhältnissen bei der Anwendung der untersuchten Antiseptica in vivo etwa näher zu kommen, haben wir in den folgenden Versuchsreihen die Präparate mit Eiweißlösungen aufgeschwemmt. Wir bedienten uns einer 2,5 proz. Lösung von Albumen ovi siccum in phys. Kochsalzlösung. Daneben wurden die Versuche mit einer Lösung von frischem Hühnereiweiß wiederholt, wodurch gleiche Ergebnisse erzielt wurden. Es wurden je 0,25 g der betr. Substanz mit der Eiweißlösung gut durchgeschüttelt und 3 Tage lang im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt (Tab. III, Spalte 1). Schmidt[1]) führt die Basizität des Eiweißes als einen der Faktoren an, durch welche aus dem Jodoform bei seiner Anwendung im Organismus Jod frei gemacht wird. Wenn diese Ansicht richtig ist, so wäre zu erwarten, daß das Jodoform, welches in dem analogen, mit seiner wässerigen Aufschwemmung angestellten Versuch kein freies Jod und auch kein solches in gebundener ionaler Form abgegeben hatte, jetzt Jod abspalten würde.

[1]) C. H. L. Schmidt, Arch. internat. de pharmacodyn. et de thérap. 9, 107. 1901.

Tabelle III.

Reagens	Spalte I. 0,25 g Substanz + 0,25 g Albumen ovi. 10 ccm Kochsalzlösung 3 Tage im Dunkeln. Eiweiß gefällt, filtriert, Filtrat versetzt mit				Spalte II. 0,25 g Substanz + 0,25 g Albumen ovi. 10 ccm Kochsalzlösung 3 Tage im diff. Tageslicht Eiweiß gefällt, filtriert, Filtrat versetzt mit				Spalte III. 0,25 g Substanz + 0,25 g Albumen ovi. 10 ccm Kochsalzlösung 3 Tage im direkten Sonnenlicht. Eiweiß gefällt, filtriert, Filtrat versetzt mit				Spalte IV. 0,25 g Substanz + 0,25 g Albumen ovi. 10 ccm Kochsalzlösung 3 Tage lang bei 37° (Brutschrank). Eiweiß gefällt, filtriert, Filtrat versetzt mit			
	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H	Jodgehalt der Eiweißfällung	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H	Jodgehalt der Eiweißfällung	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H	Jodgehalt der Eiweißfällung	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H	Jodgehalt der Eiweißfällung
Jodoform	–	–	–	+	–	–	+ + + +	+	–	–	+ + + +	Lösung frei von Eiweiß	–	–	+	+
Jodoformogen	–	–	+ + + +	+ + +	–	–	+ + + +	+ +	–	–	+ + + +	–	–	–	+ + + +	+ + + +
Jodoformin	–	–	–	+	–	–	+ + + +	+ +	–	–	+ + + +	–	–	–	+ +	+ +
Novojodin	+	+	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	–	–	+ + + +	Lösung frei von Eiweiß	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
Jodofan	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–
Europhen	–	–	–	+ + +	–	–	+ + + +	+ +	–	–	+ + + +	–	+ + +	+ + +	+ + + +	+ +
Aristol	–	–	+ + +	+ + + +	–	–	+ + + +	+ +	–	–	+ + + +	+	+ + +	+ + +	+ + + +	+ + +
Airol	–	–	+ + + +	+ +	–	–	+ + + +	+ + + +	–	–	+ + + +	Lösung frei von Eiweiß	–	–	+ + + +	+ + +
Vioform	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+ +	+	–	–	–	+
Isoform	–	–	–	–	–	–	–	+ + +	–	–	+ +	+ +	–	–	–	+
Jodol	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+ +	+ +	–	–	+	+
Jodolen	–	–	–	+ +	–	–	+ +	+	–	–	+ +	+ +	–	–	+ + +	+

Ferner würde das Eiweiß wohl auch aus den anderen Jodpräparaten stärker Jod abspalten, als es in den entsprechenden Versuchen durch die Einwirkung des Wassers geschah.

Um die Eiweißlösung von dem noch ungelösten Teil der Jodpräparate zu befreien, wurde zunächst filtriert und dann das Filtrat in zwei gleiche Teile geteilt. Der erste Teil des Filtrates wurde zur Prüfung auf freies Jod mit Jodkalistärkelösung versetzt und dabei nur in der mit Novojodin versetzten Eiweißlösung freies Jod gefunden, und zwar weniger reichlich als in dem entsprechenden Versuch mit Wasser. Daß mehr freies Jod gebunden würde, war auch nicht zu erwarten, denn ist die Basizität des Eiweißmoleküls ein Grund für die Jodabspaltung, so ist auch anzunehmen, daß das frei gewordene Jod in Bindung mit dem Eiweiß treten wird.

Wir haben dann das in der anderen Hälfte des Filtrates enthaltene Eiweiß zunächst mit wenig Salpetersäure ausgefällt und durch kurzes Aufkochen koaguliert, dann filtriert und die Filtrate mit Stärkelösung versetzt. Außer bei Novojodin fand sich auch in den Filtraten von Aristol und Jodoformogen eine Blaufärbung. Das Jod dürfte aber hier nur locker gebunden gewesen sein und vermutlich im Eiweißmolekül. Wurde alsdann das stärkehaltige Filtrat noch mit einem Tropfen rauchender Salpetersäure versetzt, so zeigte sich dadurch, daß in den mit Jodoformogen, Novojodin und Aristol versetzt gewesenen Lösungen eine starke Blaufärbung auftrat, ein gleichzeitiges Vorhandensein von löslichen Jodverbindungen an. Auch das Filtrat von Airol zeigte eine gleich starke Trübung. Hier war also auch gebundenes Jod in Lösung vorhanden, obgleich in diesem Filtrat freies Jod nicht hatte nachgewiesen werden können.

Es lag nun noch die Möglichkeit vor, daß das auf dem Filter zurückgebliebene Eiweiß jodhaltig war, selbst wenn auch der Nachweis im Filtrat nicht möglich war. Zu dem Zweck wurden die Eiweißrückstände, die mit Airol, Aristol, Jodoformogen und Novojodin angesetzt waren, bei denen also teils freies Jod, teils lösliche Jodverbindungen im Filtrat festgestellt worden waren, so lange mit Wasser auf dem Filter ausgewaschen, bis das aufgefangene Filtrat von Jod frei war. Bei den aus den übrigen Eiweißlösungen gewonnenen Filtraten war das unnötig, da diese Lösungen von vornherein kein Jod enthielten. Die auf dem Filter verbliebenen Eiweißrückstände wurden nun im Tiegel mit Soda verascht, nach

Auslaugung der Asche wurde das Filtrat mit rauchender Salpetersäure versetzt, so daß eine schwachsaure Reaktion eintrat. Beim Hinzufügen von Stärke mußte sich eine Blaufärbung zeigen, wenn das Eiweiß Jod enthalten hatte. In der Tat fand sich ein deutlicher Jodgehalt bei Airol, Aristol, Jodoform, Novojodin, Jodoformogen, Jodolen, Europhen und Jodoformin. Da das Jod durch Auswaschen mit Wasser nicht in Lösung gebracht worden war, konnte es in diesen Fällen nur an Eiweiß gebunden gewesen sein.

Da auch Jodoform Jod an Eiweiß abgegeben hatte, so kann auch durch diesen Versuch die Ansicht Schmidts, daß Eiweiß infolge seiner Basizität Jod aus Jodoform abspalte, als bestätigt gelten. Bei Jodoform und Jodoformin war die Wirkung des Eiweißes besonders deutlich. Auch in den meisten übrigen Präparaten hatte das Eiweiß, stärker als in den analogen Versuchen mit Wasser, Jod abgespalten. Lediglich in den Eiweißlösungen, die mit Vioform, Isoform, Jodol und Jodofan ausgesetzt waren, konnte nach der beschriebenen Art kein Jod nachgewiesen werden.

Die beiden weiteren Versuchsserien stellten wir an, um zu sehen, ob die Einwirkung des Lichtes auch auf die mit Eiweißlösungen angesetzten Präparate einen die Abspaltung von Jod fördernden Einfluß ausübt, ähnlich wie es sich bei den Aufschwemmungen mit Wasser ergeben hatte. Zu diesem Zwecke wurden die gleichen Gewichtsmengen der Substanzen mit derselben Menge Eiweißlösung von gleicher Art und Konzentration wie im vorigen Versuch in 2 Serien, die eine 3 Tage lang dem diffusen Tageslicht (Tab. III, Spalte 2), die andere 3 Tage lang bei wolkenlosem Himmel dem Sonnenlicht ausgesetzt (Tab. III, Spalte 4).

Es fand sich bei der Untersuchung auf freies Jod unter Einwirkung des diffusen Tageslichtes nur die mit Novojodin ausgesetzte Eiweißlösung jodhaltig, entsprechend dem vorigen unter Lichtausschluß ausgeführten Versuch. Jedoch war jetzt die Jodmenge etwas vermehrt. Nach Eiweißfällung zeigte sich auf Zusatz von Stärke allein zum Filtrat nur beim Novojodin freies Jod. Wird aber ein Tropfen rauchende Salpetersäure zugesetzt, so zeigten nicht nur die Filtrate von Jodoformogen, Novojodin, Aristol und Airol eine starke Trübung, entsprechend dem im Dunkeln angesetzten Versuch, sondern auch im Filtrat von Jodoform, Jodoformin und Europhen war reichlich, im Filtrat von

Jodolen deutlich nachweisbar Jod in gebundener Form in Lösung gegangen. Auch im Filtrat von Aristol war der Jodgehalt wesentlich stärker als im entsprechenden, vor Licht geschützt angesetzten Versuch. Keine Jodabspaltung zeigten unter den angegebenen Versuchsbedingungen nur Vioform und Jodofan. Es war also von allen Präparaten Jod an das Eiweißmolekül abgegeben worden, bei denen unter Einwirkung des diffusen Tageslichtes in dem früher mit Wasser angestellten Versuch im Filtrat Jodverbindungen in Lösung gefunden worden waren. Aber auch Isoform und Jodol, die in jedem Versuche keine jodhaltigen Substanzen in Lösung abgegeben hatten, gaben jetzt Jod an das Eiweiß ab.

Noch stärker war die Abspaltung von Jod, wenn die mit den Präparaten versetzten Eiweißlösungen dem Sonnenlicht ausgesetzt waren (Tab. III, Spalte 3). Es war dann zwar in keinem Falle freies Jod nachzuweisen, auch nicht, nachdem das Eiweiß durch verdünnte Salpetersäure und nachfolgendes Aufkochen restlos ausgefällt war, aber in gebundener Form war Jod in allen Filtraten enthalten. Bei Airol, Jodoform und Novojodin war die Jodentwicklung so stark von statten gegangen, daß beim Abfiltrieren der Reste der Präparate von der Flüssigkeit alles Eiweiß in koaguliertem Zustand — vermutlich als Jodalbuminat — auf dem Filter verblieb. Die Filtrate erwiesen sich vollständig frei von Eiweiß. In den Fällen, wo im Filtrat mit verdünnter Salpetersäure noch ein Niederschlag von Albumen erzielt werden konnte, war die Menge dieses Niederschlages nur noch gering; sie war viel geringer, als sie nach der ursprünglichen Konzentration hätte sein müssen. Also auch hier war eine teilweise Ausfällung des Eiweißes durch das unter der Einwirkung des Sonnenlichtes frei gewordenen Jod zustande gekommen.

Nach der unter der Einwirkung des Sonnenlichtes reichlichen Jodabspaltung durfte man wohl annehmen, daß die geringen Eiweißmengen, die in der Mehrzahl der Fälle noch aus den Filtraten ausgefällt werden konnten, deutlich Jod enthalten würden. Aber nur das mit Aristol, Vioform, Isoform, Jodol und Jodolen ausgesetzt gewesene Eiweiß erwies sich als jodhaltig. In dem aus den Filtraten von Europhen, Jodoformogen, Jodoformin und Jodofan gewonnenen Eiweiß war kein Jodgehalt festzustellen, obschon diese Substanzen in der Mehrzahl der bisherigen Versuche

stark Jod abgespalten hatten. Die Erklärung dafür liegt wohl in dem Umstand, daß unter dem Einfluß des Sonnenlichtes das jodhaltige Eiweiß als unlösliches Jodalbuminat ausgefallen war.

Wir haben dann weiter noch einen Versuch angestellt, bei dem die Substanz mit Eiweißlösung aufgeschwemmt, 3 Tage lang im Brutschrank bei einer Temperatur von 37° gehalten wurde (Tab. III, Spalte 4). Freies Jod enthielten die Lösungen, die mit Novojodin, Aristol und Europhen versetzt waren. Nach Ausfällung des gelösten Eiweißes fanden sich in den mit Jodol, Jodolen, Aristol, Airol, Europhen, Jodoform, Jodoformogen, Jodofan und Novojodin versetzt gewesenen Lösungen gelöste Jodverbindungen. Ähnlich war das Verhalten der Eiweißfällungen; hierbei ergab sich aber, daß auch aus Vioform und Isoform Jod abgespalten worden war, denn die betr. Eiweißfällungen erwiesen sich jodhaltig. Andererseits war das mit Jodofan behandelte Eiweiß frei von gebundenem Jod, obwohl das Filtrat geringe Mengen einer gelösten Jodverbindung enthalten hatte.

Einen analogen Versuch haben wir endlich noch mit einer menschlichen Aszitesflüssigkeit angestellt (Tab. IV, Spalte 1 und 2). Die Ergebnisse wichen nur in soweit von denen des Vorversuches ab, als sich in keinem Falle in der Lösung freies Jod nachweisen ließ. Nachdem nun das Eiweiß aus der Aszitesflüssigkeit ausgefällt war, zeigten die Filtrate in allen Fällen, in denen sie im entsprechenden mit Albumen ovi ausgeführten Versuch einen Gehalt an gebundenem Jod gezeigt hatten, dieses auch jetzt. Auch das ausgefällte Eiweiß verhielt sich genau dem vorigen Versuch entsprechend. Ein mit einer Aufschwemmung von Eiter in physiologischer Kochsalzlösung angestellter Versuch führte ebenfalls zu übereinstimmenden Resultaten (Tab. IV, Spalte 3).

Legt man bei der Betrachtung des Gesamtergebnisses die einzelnen Präparate zugrunde, so ergibt sich folgende Übersicht:

Aus trockenem Jodoform war eine Abspaltung von freiem Jod nur unter der Einwirkung direkten Sonnenlichtes nachzuweisen. Wurde Jodoform mit Wasser angesetzt, so genügte eine Temperatur von 37° oder auch diffuses Tageslicht, um in der Flüssigkeit eine Lösung jodhaltiger Substanzen herbeizuführen.

Tabelle IV.

Reagens	Spalte I. 0,25 g Substanz 10 ccm Ascitesflüssigkeit 3 Tage lang bei 37° Eiweiß gefällt, filtriert, Filtrat versetzt mit				Spalte II. 0,25 g Substanz, 10 ccm Ascitesflüssigkeit 3 Tage lang bei 37° Eiweiß gefällt, filtriert, Filtrat versetzt mit				Spalte III. 0,25 g Substanz, 10 ccm Eiter + phys. Kochsalzlösung 3 Tage bei 37° Eiweiß gefällt, filtriert, Filtrat versetzt mit		
	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H	Jodgehalt der Eiweißfällung	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H	Jodgeh. der Eiweißfäll.	Jodkalistärkelösung	Stärkelösung	Stärkelösung + rauch. NO_3H
Jodoform	−	−	+++	++	−	−	++++	−	−	−	+
Jodoformogen	−	−	+++	++++	−	−	++++	−	−	−	++
Jodoformin	−	−	++	+++	−	−	++++	−	−	−	+
Novojodin	−	−	++++	++++	−	−	++++	+	+	+	++++
Jodofan	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	++
Europhen	−	−	++++	+++	−	−	++++	−	−	−	++++
Aristol	−	−	++++	+++	−	−	++	−	−	−	+++
Airol	−	−	++++	++++	−	−	++++	−	−	−	++++
Vioform	−	−	−	++	−	−	++	−	−	−	−
Isoform	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−
Jodol	−	−	++	++++	−	−	++++	−	−	−	++
Jodolen	−	−	++	++++	−	−	++++	−	−	−	++

Freies Jod war auch dann nur nach Einwirkung von Sonnenlicht vorhanden. (Bekanntlich spaltet Jodoform auch in ätherischer Lösung schnell Jod ab.) Wird Jodoform mit einer Eiweißlösung zusammengebracht, so bilden sich schon bei Zimmertemperatur und unter Ausschluß von Licht, mehr bei erhöhter Temperatur und Lichteinwirkung Jodeiweißverbindungen. Freies Jod war in den mit Eiweißlösungen und Jodoform angestellten Versuchen nicht nachzuweisen.

Jodoformogen ist in Wasser schwer löslich, jedoch leichter als Jodoform; schon diffuses Licht oder eine Temperatur von 37° genügt, die trockene Substanz soweit zu verändern, daß sich eine leicht in Wasser lösliche Jodverbindung bildet. Freies Jod wurde nur nach Einwirkung direkten Sonnenlichtes gefunden. Mit Wasser aufgeschwemmt, löst sich das Präparat schon bei Zimmertemperatur unter Ausschluß jeglicher Lichteinwirkung in nachweisbaren Mengen, doch war eine Abspaltung von freiem Jod auch bei Sonnenlichteinwirkung nicht nachzuweisen. Gegenüber Eiweißlösungen verhält es sich analog dem Jodoform.

Jodoformin unterscheidet sich in seinem Verhalten vom Jodoform dadurch, daß das trockene Präparat schon nach Aufbewahrung von diffusem Licht oder unter einer Temperatur von 37° eine leichtere Löslichkeit zeigte. Im übrigen verhielt es sich in allen Fällen dem Jodoform entsprechend.

Novojodin dürfte wohl dasjenige Präparat unter allen den untersuchten sein, das am leichtesten Jod abspaltet. Das trockene Präparat, sowie die Aufschwemmung in Wasser, enthielten in allen Fällen freies Jod. Außerdem ist das Präparat in Wasser verhältnismäßig leicht löslich. Auf Grund seiner leichten Jodabgabe scheint Novojodin als Dauerwundantiseptikum durchaus geeignet.

Jodofan dagegen zeigt als trockene Substanz nur nach Einwirkung des Sonnenlichtes eine Abspaltung von Jod. Es ist in Wasser fast unlöslich. Wurde es mit Wasser oder Eiweißlösung angesetzt, so fand sich im Filtrat nach Einwirkung des Sonnenlichtes oder einer Temperatur von 37° gelöste jodhaltige Substanz.

Europhen zeigte als trockenes Präparat nach Licht- oder Wärmeeinwirkung eine Abspaltung freien Jods. Mit Wasser aufgeschwemmt lösen sich schon unter Lichtabschluß und bei Zimmertemperatur geringe Mengen einer jodhaltigen Verbindung. Licht-

einwirkung scheint die Löslichkeit zu befördern. Bei erhöhter Temperatur wird auch freies Jod abgespalten. Mit Eiweißlösungen bildet es leicht Jodeiweißverbindungen. Drei Tage lang in einer Eiweißlösung von 37° gehalten, kann es freies Jod abspalten.

Aristol ist schwer in Wasser löslich, etwas besser bei starker Sonnenbelichtung. In geringen Mengen ist freies Jod vorhanden. Durch Licht wird die Abspaltung von freiem Jod befördert. Mit Wasser angesetzt, findet sich im Filtrat schon nach Einwirkung diffusen Lichtes freies Jod, ebenso unter erhöhter Temperatur. Eiweißlösung von 37° mit Aristol versetzt, enthält freies Jod.

Airol löst sich schon in unverändertem Zustande ziemlich leicht in Wasser. Jod spaltet das Mittel ab, wenn es mit Wasser aufgeschwemmt dem Sonnenlicht ausgesetzt wird. Mit Airol versetzte Eiweißlösung nimmt daraus leicht Jod auf.

Vioform ist in Wasser nur etwas löslich nach Einwirkung von Sonnenlicht und in der Wärme. Eine Abspaltung freien Jods war auch unter Sonnenlicht nicht nachweisbar. Vioformhaltige Eiweißlösungen zeigten sich nur nach Sonnenbestrahlung oder bei 37° Wärme jodhaltig.

Isoform spaltet als trockene Substanz nur im Sonnenlicht freies Jod ab. Es ist in Wasser unlöslich, löst sich aber leichter nach Sonnenbestrahlung und spaltet dann auch in einer Aufschwemmung mit Wasser freies Jod ab. Eine Isoform-Eiweißlösung erwies sich nur nach Licht- und Wärmeeinwirkung jodhaltig.

Jodol spaltet im Sonnenlicht freies Jod ab. Es ist in Wasser nur nach Licht- oder Wärmeeinwirkung löslich; Jodol-Eiweißlösungen waren jodhaltig, wenn sie belichtet oder bei 37° drei Tage lang aufbewahrt wurden.

Jodolen ist in Wasser nur wenig löslich und mit ihm angesetzte Eiweißkörper in wässeriger Lösung nahmen stets aus ihm Jod auf.

Im allgemeinen kann also gesagt werden, daß einige der untersuchten Präparate das Jod nur sehr locker gebunden enthalten und es leicht abspalten (Novojodin), während andere (Vioform) wieder sehr beständig sind. Ob nun auch diejenigen Substanzen, die am leichtesten Jod abspalten, auch praktisch betrachtet, die besten Antiseptica sind, läßt sich nur in exakten Versuchen durch Einwirken dieser Präparate auf pathogene Keime feststellen.

Zieht man aber die praktische Verwendung der einzelnen Mittel in Betracht, so findet man, daß diejenigen Mittel sich vielfach größerer Beliebtheit erfreuen, die verhältnismäßig wenig Jod abspalten, wie Jodoform und Vioform, als andere, deren Jodabspaltbarkeit eine größere ist (Novojodin, Aristol, Europhen).

Die antiseptische Wirkung des Vioforms und Jodoforms ist in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen und hat sich auch in Praxi bis auf den heutigen Tag bewährt. Jedenfalls ist die bakterizide Wirkung des Novojodins, Airols, Aristols und Europhens nicht in dem Maße stärker, als es der verhältnismäßig starken Abspaltung von Jod aus den zuletzt genannten Präparaten entspricht. Man wird also im Widerspruch mit der Binzschen Theorie über die Wirkung des Jodoforms anzunehmen haben, daß die Wirkung nicht — oder nicht ausschließlich — auf der Abspaltung von freiem Jod beruht, sondern daß vielleicht doch das intakte Molekül oder andere Abbauprodukte desselben an der Wirkung mitbeteiligt sind.

Beiträge zur Chemie der Bildung und Reifung des Bienenhonigs.

Von

E. Sarin (Riga).

(Eingegangen am 12. Mai 1921.)

Der Honig ist das gemeinsame Erzeugnis der lebenden Pflanze und der Arbeitsbiene. Doch ist sowohl die Frage, auf welche Weise der Nektar in Honig verwandelt wird, als auch die allgemeine Frage nach der Physiologie der Verdauung bei der Biene bisher noch sehr wenig studiert worden. Mit Sicherheit ist bekannt, daß der Nektar und die übrigen zuckerhaltigen Stoffe, zu denen die Biene Zutritt hat, von ihr in einen besonderen Magen, den sog. Honigmagen, eingesammelt und aus ihm, nach der Heimkehr der Biene in den Stock, in die Waben abgelegt werden.

Ob nun der Honigmagen der Arbeitsbiene nur als Vorratskammer zur zeitweiligen Aufbewahrung des Nektars anzusehen ist, oder ob in ihm neben der Spaltung des Rohrzuckers noch irgendwelche andere komplizierteren biochemischen Prozesse vor sich gehen, — ist noch nicht erforscht. Gleicherweise sind wir wenig über diejenigen weiteren Prozesse unterrichtet, die im Nektar nach seiner Ablegung in die Waben im Zusammenhang mit der Reifung des Honigs stattfinden.

Um nun die eben angeführten Fragen in gewissem Grade zu beleuchten, habe ich auf dem Bienenstand der bakteriologischen Abteilung des Landwirtschaftlichen Gelehrten-Komitees in Petersburg einige Versuche angestellt. Im Anfang des Sommers und Spätherbstes, als die Blütezeit noch nicht eingetreten bzw. vergangen war, habe ich den Bienen Rohrzucker als Futter vorgesetzt. Durch die Untersuchung des auf diese Weise erhaltenen Zuckerhonigs suchte ich einige Prozesse, die bei der Bildung und Reifung des Honigs stattfinden, zu verfolgen und zu ergründen.

In erster Linie interessierte mich die Frage, was mit dem Zuckersirup geschieht, wenn man ihn mehrere Male durch den Organismus der Biene hindurchführt.

Zu diesem Zweck wurden 2 Völkern mittlerer Stärke (Stöcke System Dadan-Blatt) je 25 Pfund Sirup verabfolgt. Nach 2 Tagen, als die Bienen schon das ganze ihnen vorgesetzte Futter in die Waben abgelegt hatten, wurde der Honig herausgenommen, zentrifugiert, ein Teil für die Analyse zurückgestellt, die übrigen Mengen dagegen an dieselben Völker verfüttert. Der von den Bienen zum zweiten Male in die Waben abgelegte Honig blieb in den Stöcken bis zur Reife; erst als die Bienen die Waben zu verschließen begannen, wurde der Honig herausgenommen und zum dritten Male den Bienen vorgesetzt. Nach 3tägigem Verweilen im Stock wurde dieser Honig dann untersucht.

Tabelle I.

Bestandteile	Sirup Nr. 1. Verfüttert den 19. Juni 1915.	Honig Nr. 1. Von den Bienen aus Sirup Nr. 1 erzeugt. Herausgenommen am 21. Juni 1915.	Honig Nr. 2. Von den Bienen aus dem am 21. Juni 1915 verfütterten Honig Nr. 1 erzeugt. Herausgenommen am 8. Juli 1915.	Honig Nr. 3. Von den Bienen aus dem am 8. Juli 1915 verfütterten Honig Nr. 2 erzeugt. Herausgenommen am 7. Juli 1915.
Spez. Gewicht der Lösung 1:2 bei 15° C	1,0952	1,1055	1,1180	1,1156
Trockensubstanz	67,92%	74,97 %	82,68 %	81,14 %
Wasser	32,08%	25,03 %	17,32 %	18,86 %
Invertzucker	0	43,11 %	69,60 %	73,59 %
Saccharose	67,92%	28,05 %	9,53 %	3,96 %
Gesamte Zuckermenge	67,92%	71,16 %	79,13 %	77,55 %
Nichtzucker	0	3,81 %	3,55 %	3,59 %
Asche	—	0,043%	0,072%	0,064%
Säure, ber. auf Ameisensäure	0	0,028%	0,046%	0,055%
Albuminate nach Lund, durch Phosphorwolframsäure gefällt	0	0	0,2 ccm	0,2 ccm
Polarisation einer 10proz. Lösung: vor	—	+3,04°	+0,60°	−1,05°
Polarisation einer 10proz. Lösung: nach der Inversion	—	−2,23°	−1,86°	−1,99°
Katalase	0	0	0	0
Diastase[1])	0	2,2 ccm	9,0 ccm	14,0 ccm
Invertase	0	vorhanden	vorhanden	vorhanden

[1]) Die Diastase ist in Kubikzentimetern einer 2proz. Lösung von löslicher Stärke ausgedrückt, wobei 5 ccm einer Honiglösung 1 : 2 mit der Stärke eine Stunde lang auf 45° C gehalten wurden, wie es in meiner oben angeführten Schrift beschrieben ist.

Die bei der Untersuchung erhaltenen Resultate sind in den Tabellen I und II dargestellt[1]).

Tabelle II.

Bestandteile	Sirup Nr. 2. Verfüttert am 21. Juni 1915.	Honig Nr. 1a. Von den Bienen aus Sirup Nr. 2 erzeugt. Herausgenommen am 28. Juni 1915.	Honig Nr. 2a. Von den Bienen aus dem am 28. Juni 1915 verfütterten Honig Nr. 1a erzeugt. Herausgenommen am 6. Juli 1915.	Honig Nr. 3a. Von den Bienen aus dem am 6. Juli 1915 verfütterten Honig Nr. 2a erzeugt. Herausgenommen am 8. Juli 1915.
Spez. Gewicht der Lösung 1:2 bei 15° C	1,0752	1,0915	1,1162	1,1152
Trockensubstanz	54,46%	65,49 %	81,39 %	80,88 %
Wasser	45,54%	34,51 %	18,61 %	19,12 %
Invertzucker	0	42,36 %	71,30 %	73,54 %
Saccharose	54,46%	21,43 %	7,35 %	3,61 %
Gesamte Zuckermenge	54,46%	63,79 %	78,65 %	77,15 %
Nichtzucker	0	2,70 %	2,74 %	3,53 %
Asche	—	0,033%	0,057%	0,064%
Säure, bez. auf Ameisensäure	0	0,028%	0,051%	0,051%
Albuminate nach Lund, durch Phosphor-Wolframsäure gefällt	0	Spuren	0,1 ccm	0,3 ccm
Polarisation der 10proz. Lösung vor	—	+3,18°	−0,65°	−1,02°
Polarisation der 10proz. Lösung nach der Inversion	—	−1,95°	−1,93°	−2,07°
Katalase	0	0	0	0
Diastase	0	2,5 ccm	10,5 ccm	15,0 ccm
Invertase	0	vorhanden	vorhanden	vorhanden

Bei der Betrachtung der in den Tabellen angeführten Daten kann man folgendes bemerken.

Wasser.

Der von den Bienen in die Waben abgelegte Zuckersirup hatte im Laufe eines 48stündigen Verweilens im Stock im ersten Falle 7,05%, im zweiten Falle 11,03% Wasser verloren. Von der gesamten Menge (25 Pfund) des verfütterten Zuckersirups sind im ersten Falle 705 g, im zweiten 1103 g Wasser verdampft; wie aus der Tabelle ersichtlich, geht die Wasserverdampfung desto intensiver vor sich, je verdünnter das Futter ist.

Wenn wir die Analysenresultate der Honigproben Nr. 2 und Nr. 2a betrachten, die von den Bienen aus „Honig" Nr. 1 und Nr. 1a erzeugt

[1]) Die Methodik der Honiguntersuchung ist von mir ausführlich behandelt worden im Bd. IV, S. 1—137 der Arb. a. d. Landwirtschaftlich-bakteriolog. Laborator. d. Ackerbauminister. in Petersburg: Sarin, E., Der Honig und die Methoden seiner Untersuchung (russ.).

sind, so fällt der Umstand auf, daß die Bienen die beiden Honigproben gleichzeitig (nach 13 Tagen) zu verschließen begannen, wobei der Wassergehalt in beiden Fällen fast der gleiche war (17,32 und 18,61%), ungeachtet des verschiedenen ursprünglichen Wassergehalts (32,08% in Probe Nr. 1 und 45,54% in Probe Nr. 1a).

Bei den Proben Nr. 2 und Nr. 2a dagegen finden wir nicht mehr die Verhältnisse zwischen der Konzentration des Futters und der Menge des verdampften Wassers, die sich in den Proben Nr. 1 und Nr. 1a bemerken ließen. Der Verdickungsprozeß des Honigs hängt scheinbar mit anderen bei der Reifung des Honigs stattfindenden Prozessen zusammen, und im Zusammenhang mit den letzteren reguliert die Biene die Wasserverdampfung.

In den von den Bienen aus zugedecktem reifen Honig erzeugten Proben Nr. 3 und Nr. 3a hat die Wassermenge nicht mehr abgenommen, im Gegenteil sich sogar ein wenig vergrößert. Dieser Umstand konnte vielleicht dadurch erklärt werden, daß um die Zeit dieser Versuche die Bienen zur Honigbereitung nicht nur das ihnen vorgesetzte Futter benutzten, sondern auch schon Blüten besuchen konnten.

Zucker.

Wie bekannt geht bei der Bildung und Reifung des Honigs der Rohrzucker unter dem Einfluß der Invertase in Invertzucker über.

Die im reifen Naturhonig enthaltene Rohrzuckermenge übersteigt gewöhnlich nicht 3—4%.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, hat sich bei unseren Versuchen im Laufe von 2 Tagen in Honig Nr. 1 43,11%, in Honig Nr. 1a 42,36% Invertzucker gebildet. Wir sehen also, daß in beiden Proben fast die gleichen Mengen Invertzucker vorhanden sind, ungeachtet dessen, daß in bezug auf den quantitativen Gehalt an Rohrzucker und Wasser die betreffenden Sirupe sich untereinander beträchtlich unterschieden.

Während im Honig Nr. 1 sich im Laufe von 2 Tagen 43,11% Invertzucker gebildet haben, hat die Menge dieses Zuckers im Honig Nr. 2 im Laufe von weiteren 13 Tagen nur um 26,49% zugenommen. Ungefähr dieselbe Erscheinung bemerken wir auch beim Honig Nr. 2a.

Diese Daten lassen also den Schluß zu, daß die Inversion des Rohrzuckers im Stock zuerst verhältnismäßig schnell verläuft, daß jedoch später, nach Maßgabe der Bildung des Invertzuckers, der Prozeß allmählich verlangsamt wird.

Obgleich die Proben Nr. 2 und Nr. 2a bei Beginn des Verschlusses der Waben, also in reifem Zustande, aus dem Stocke ge-

nommen wurden, enthalten sie doch noch beträchtliche Mengen an Rohrzucker (9,53% und 7,35%). Jedenfalls enthält der reife Naturhonig nicht solche großen Mengen davon. In den Proben Nr. 3 und Nr. 3a liegt dagegen der Gehalt an Rohrzucker in den Grenzen der im reifen Naturhonig vorkommenden Mengen.

Nichtzucker.

Unter dem Ausdruck Nichtzucker versteht man, wie bekannt, in der Honiganalyse die Differenz zwischen der Gesamtzuckermenge und der Menge des Trockenrückstandes.

Nach den jetzigen Anschauungen wird der Rohrzucker bei der Bildung und Reifung des Honigs außer der Inversion keinem anderen Prozesse, weder im Organismus der Biene, noch im Stocke, unterworfen.

Wenn es wirklich so wäre, so müßte die Gesamtmenge des im Honig gefundenen Zuckers der Menge des Trockenrückstandes entsprechen, da bei unseren Versuchen die Bienen ausschließlich Rohrzucker erhielten. Wir bemerken jedoch, daß die Differenz zwischen der Gesamtzuckermenge und der Menge des Trockenrückstandes zwischen 2,70—3,81% schwankt. Folglich bildet sich auch im Zuckerhonig, ebenso wie im Naturhonig, eine gewisse Menge Nichtzucker.

Die im Naturhonig enthaltene Menge Nichtzucker schwankt zwischen 3—10%, je nach der Pflanzenart, aus denen Blüten die Bienen den Nektar sammeln. Bisher hielt man allen im Honig vorkommenden Nichtzucker (dextrinartige Stoffe) für Produkte pflanzlicher Herkunft, welche die Bienen zusammen mit dem Nektar aus den Blüten sammeln und in unverändertem Zustande in die Waben ablegen. Die Resultate unserer Versuche zeigen jedoch, daß im Honig außer dextrinartigen Körpern pflanzlichen Ursprungs auch solche vorkommen, die vom Organismus der Biene mit Hilfe eines Fermentes gebildet werden.

Aus dem Angeführten ist es erlaubt den Schluß zu ziehen, daß im Honigmagen der Biene und im Stock während der Reifung des Honigs in Hinsicht auf den Zucker zwei entgegengesetzte Prozesse vor sich gehen: einerseits die Umwandlung des Rohrzuckers in Invertzucker, andererseits die Bildung dextrinartiger Stoffe, welche Fehlingsche Lösung nicht reduzieren.

Asche.

Die Aschenmenge in den erhaltenen Proben des Zuckerhonigs schwankt zwischen 0,043—0,073%. Die Anwesenheit mineralischer Stoffe erklärt sich in diesem Fall aus dem Umstande, daß auch Rohrzucker einen kleinen Aschengehalt aufweist.

Säure.

In allen Proben des erhaltenen Honigs wurde eine geringe Säuremenge gefunden, die bei jeder Hindurchführung des Honigs durch den Organismus der Biene sich um ein weniges vermehrte. Dabei verläuft die Erhöhung der Acidität, ähnlich der Bildung des Invertzuckers und der Verdampfung des Wassers, zuerst recht schnell, wird aber dann, im Zusammenhange mit der Bildung einer gewissen Säuremenge, wieder langsamer und hört schließlich ganz auf.

Sehr charakteristisch ist auch der Umstand, daß bei Ansäuerung des zur Verfütterung bestimmten Sirups mit 0,1% und selbst mit 0,3% Zitronensäure, eine merkliche Bildung neuer Säuremengen im erhaltenen Honig nicht festzustellen war, wie das aus den weiteren Versuchen zu ersehen sein wird. Es scheint, daß bei einer Acidität des Sirups oder Honigs von etwa 0,1% der Prozeß der Säurebildung aufhört. In der Tat finden wir auch, daß die im Naturhonig befindliche Acidität gewöhnlich zwischen 0,08—0,12% beträgt.

Fast bis zur jüngsten Zeit nahm man an, daß die Ameisensäure als die beständig im Honig vorkommende und vorherrschende Säure anzusehen sei, und daher ist es auch bis jetzt noch üblich den Säuregehalt des Honigs auf Ameisensäure zu berechnen. Doch haben Farnsteiner[1]), Finke[2]) u. a. bewiesen, daß diese Ansicht nicht der Wirklichkeit entspricht, und daß die Ameisensäure nur in äußerst geringer Menge im Honig erhalten ist, in den meisten Fällen jedoch gänzlich fehlt.

Nach den vorhandenen Literaturangaben können im Honig folgende Säuren enthalten sein: Apfel-, Milch-, Wein-, Oxal-, Zitronen- und Ameisensäure. Jedoch nicht ein jeder Honig enthält alle diese Säuren. Es scheint, sie werden von den Bienen gleich-

[1]) Farnsteiner, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **15**, 598. 1908.

[2]) Finke, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **23**, 255. 1912.

zeitig mit dem Nektar eingesammelt, und daher hängt sowohl die Anwesenheit als auch die Menge dieser oder jener Säure von der Pflanzenart ab, von deren Blüten die Bienen den Honig sammeln.

Aller Wahrscheinlichkeit nach erzeugt die Biene desto weniger Säure, je mehr davon im Nektar enthalten ist. Doch ist es auch nicht ausgeschlossen, daß neben dem Prozeß der Säurebildung, im Honig auch eine gewisse Verminderung des Säuregrades stattfindet, hervorgerufen durch den Zerfall der zweibasischen Säuren in einbasische und in Wasser, wie das bei der Gärung und Bildung des Weines vor sich geht. Es muß bemerkt werden, daß die Frage nach der Acidität des Honigs noch weiterer Bearbeitung bedarf.

Eiweißstoffe.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, finden sich im Honig Nr. 1 keine Eiweißstoffe, im Honig Nr. 2 nur Spuren. Obgleich bei der wiederholten Hindurchführung des Honigs durch den Organismus der Biene diese Stoffe nicht nur erscheinen, sondern auch deren Menge sich allmählich vermehrt, so kann man doch nicht mit Bestimmtheit sagen, daß sie tatsächlich spezifische Produkte der Biene sind, da es in diesem Falle nicht gänzlich ausgeschlossen erscheint, daß die Bienen bei der Erzeugung dieses Honigs nicht auch Blütenstaub benutzen konnten.

Fermente.

Nach den vorhandenen Literaturangaben sind im Honig folgende Fermente enthalten. Invertase, Diastase, Katalase und ein proteolytisches Ferment. Ob die Fermente im Organismus der Biene gebildet werden, oder ob die Biene sie zusammen mit dem Nektar aus den Pflanzen sammelt — ist nicht genau bekannt. — Langer[1]) kommt auf Grund serologischer Untersuchungen zum Schluß, daß die Fermente des Honigs als spezifische Produkte des Honigs anzusehen sind.

Küstenmacher[2]) dagegen sagt, die Fermente würden von den Pflanzen im Spermatoplasma des Blütenstaubes gebildet und kämen aus diesem in den Honig.

Da bei unseren Versuchen die Bienen ausschließlich Rohrzucker erhielten, der bekanntlich gar keine Fermente enthält, so

[1]) Langer, Arch. f. Hyg. **71**, 308. 1909.
[2]) Küstenmacher, diese Zeitschr. **30**, 248. 1910.

wird durch die Feststellung der Anwesenheit der Fermente im erhaltenen Zuckerhonig auch die Frage nach ihrer Herkunft gelöst.

Invertase. Der Umstand, daß sich aus dem den Bienen verfütterten Rohrzucker Invertzucker gebildet hat, beweist die Anwesenheit von Invertase im erhaltenen Honig und deren tierischen Ursprung.

Katalase. In allen erhaltenen Proben des Zuckerhonigs fehlte Katalase.

Folglich wird dieses Ferment vom Organismus der Biene nicht gebildet, und die im Naturhonig enthaltene Katalase entstammt dem Nektar.

Da der nicht über 70° C erhitzte Naturhonig Katalase enthält, so hat der eben angeführte Umstand praktische Bedeutung bei der Erkennung von Honig, der von den Bienen bei intensiver Rohrzuckerfütterung gebildet wird.

Diastase. Wie aus den angeführten Tabellen ersichtlich, wurde in allen von uns untersuchten Honigproben Diastase festgestellt.

Dabei vergrößerte sich allmählich die Menge dieses Ferments bei jedesmaliger Hindurchführung durch den Organismus der Biene. Folglich erscheint die im Honig enthaltene Diastase als spezifisches Sekret der Arbeitsbiene.

Die angeführten Versuche lösen bei weitem nicht die hier aufgerollten Fragen. Im Gegenteil, bei der aufmerksamen Durchsicht der in den Tabellen niedergelegten Daten entsteht eine ganze Reihe neuer Fragen, zu deren Beantwortung die Versuche auch fernerhin fortgesetzt werden sollen.

Schlußfolgerungen.

1. Bei der Bildung und Reifung des aus Zuckersirup gewonnenen Honigs geht eine Reihe komplizierter biochemischer Prozesse vor sich.

2. Neben der Spaltung des Rohrzuckers bildet sich eine gewisse Menge die Fehlingsche Lösung nicht reduzierender dextrinartiger Stoffe, die als Produkte einer reversiblen Tätigkeit der Invertase bzw. Diastase an-

zusehen sind. Folglich ist im Naturhonig, außer dem Nichtzucker pflanzlichen Ursprunges, auch solcher erhalten, der vom Organismus der Biene mit Hilfe des Fermentes erzeugt wird.

3. Die Fermente Invertase und Diastase erscheinen als spezifische Produkte der Arbeitsbiene, während die Katalase, die nur im Naturhonig, dagegen nicht im Zuckerhonig vorkommt, als ein Produkt pflanzlicher Herkunft anzusehen ist.

Einfluß organischer Säuren auf die Bildung und Reifung des Zuckerhonigs.

Von

E. Sarin (Riga).

(Eingegangen am 12. Mai 1921.)

In Jahren, wo der Honigertrag ein so geringer ist, daß die Bienen nicht mal imstande sind, den für den Winter nötigen Vorrat einzutragen, sind die Bienenzüchter gezwungen, um ihre Bienen vom Hungertode zu retten, dieselben mit Zucker zu füttern.

Zu dem als Nahrung für die Bienen bestimmten Zuckersirup pflegen die Bienenzüchter irgendeine Säure hinzuzufügen, in der Meinung, daß der Zucker sonst von den Bienen nicht assimiliert werde, und daß außerdem die Säure den Inversionsprozeß des Rohrzuckers, d. h. seine Umwandlung in die im Honig enthaltene Zuckerart, fördere.

Um dieser Frage, inwiefern der Zusatz einer Säure zum Zuckersirup erforderlich ist, näherzutreten, habe ich im Frühjahr und Herbst des Jahres 1916, als keine Tracht vorhanden war, folgende Versuche angestellt.

Versuch 1: Zuckersirup mit 0,1% Citronensäure. 2 Völker mittlerer Stärke erhielten Zuckersirup ohne Säurezusatz und 2 andere denselben Sirup, doch mit einem Zusatz von 0,1% Citronensäure, jedes Volk je 25 Pfund. Der von den Bienen erzeugte Honig wurde erst dann aus dem Stock entfernt, als die Bienen schon an den Verschluß der Waben schritten.

Die bei der Untersuchung erhaltenen Resultate sind in den Tabellen I und II zusammengestellt.

Beim Vergleich der in den Tabellen I und II angeführten Daten sehen wir, daß in der chemischen Zusammensetzung des Honigs, der von den Bienen aus dem reinen Zuckersirup erzeugt wurde, und des aus dem mit 0,1% Citronensäure versetzten Sirups kein merklicher Unterschied besteht.

Also kann in diesem Falle keine Rede davon sein, daß die Säure irgendeinen nützlichen Einfluß auf den Inversionsprozeß des Rohrzuckers und auf die Reifung des Honigs im allgemeinen ausübt. Im Gegenteil, die größere

Tabelle I.

Bestandteile	Sirup Nr. 3 (ohne Säure). Verfüttert am 18. Juni 1916.	Honig Nr. 4. Von den Bienen aus Sirup Nr. 3 erzeugt. Herausgenommen am 28. Juni 1916.	Sirup Nr. 4 (mit Säure). Verfüttert am 18. Juni 1916.	Honig Nr. 5. Von den Bienen aus Sirup Nr. 4 erzeugt. Herausgenommen am 28. Juni 1916.
Spez. Gewicht der Lösung 1 : 2 bei 15° C	1,0755	1,1185	1,0765	1,1158
Trockensubstanz	55,32%	83,01%	55,11%	81,27%
Wasser	44,68%	16,99%	44,89%	18,73%
Invertzucker	0	76,88%	0	72,00%
Saccharose	55,32%	2,59%	55,11%	4,56%
Gesamte Zuckermenge	55,32%	79,47%	55,11%	76,56%
Nichtzucker	0	3,54%	0	4,71%
Asche	—	0,105%	—	0,112%
Säure, berechn. auf Ameisensäure*)	0	0,086%	0,083%	0,126%
Polarisation (10 proz. Lösung) vord. Inversion	—	−2,07°	—	−1,58°
Polarisation (10 proz. Lösung) nach d. „	—	−2,56°	—	−2,25°
Katalase	0	0	0	0
Diastase	0	20,0 ccm	0	8,0 ccm
Invertase	0	vorhanden	0	vorhanden

*) Um Resultate zu erhalten, die mit denen der Honiganalyse vergleichbar wären, habe ich in diesem Falle den Säuregehalt auf Ameisensäure berechnet, wie er im Honig berechnet zu werden pflegt; in Wirklichkeit jedoch war zum Zuckersirup Citronensäure hinzugefügt worden.

Menge Rohrzucker und der geringere Gehalt an Diastase in den aus angesäuertem Sirup erhaltenen Honigproben deuten sogar auf einige schädliche Seiten des Säurezusatzes hin.

Der Umstand, daß die aus neutralem Zuckersirup erhaltenen Honigproben Nr. 4 und Nr. 6 den normalen Säuregehalt zeigen, deutet daraufhin, daß die Bienen selbst je nach Bedarf die für sie nötige Säuremenge bilden, folglich auch keiner fremden Säuren bedürfen.

Währenddessen hat sich in den aus angesäuertem Sirup erhaltenen Honigproben Nr. 5 und Nr. 7 die Säuremenge fast gar nicht vermehrt; die in diesen Proben beobachtete Erhöhung des Säuregrades ist dadurch hervorgerufen, daß aus dem Honig eine beträchtliche Wassermenge verdampft ist. Folglich findet in diesem Falle hauptsächlich eine relative, jedoch nicht eine wirkliche Erhöhung des Säuregehaltes statt. Es scheint, daß die Biene sich bei der Erzeugung der einen oder anderen Säuremenge nach der Reaktion des Sirups oder Honigs richtet.

Beim Vergleiche der Untersuchungsresultate der eben betrachteten Tabellen mit den in meiner vorhergehenden Arbeit[1]) angeführten Tabellen I

[1]) Sarin, Beiträge zur Chemie der Bildung und Reifung des Bienenhonigs. Diese Zeitschr. **120**, S. 250. 1921.

Tabelle II.

Bestandteile	Sirup Nr. 5 (ohne Säure). Verfüttert am 9. Juni 1916.	Honig Nr. 6. Von den Bienen aus Sirup Nr. 5 erzeugt. Herausgenommen am 28. Juni 1916.	Sirup Nr. 6 (mit 0,1% Citronensäure). Verfüttert am 9. Juni 1916.	Honig Nr. 7. Von den Bienen aus Sirup Nr. 6 erzeugt. Herausgenommen am 28. Juni 1916.
Spez. Gewicht der Lösung bei 15° (1 : 2)	1,1002	1,1220	1,0988	1,1205
Trockensubstanz	71,07%	85,20%	70,35%	84,30%
Wasser	28,93%	14,80%	29,65%	15,70%
Invertzucker	0	73,67%	0	72,08%
Rohrzucker	71,07%	4,64%	70,35%	6,00%
Gesamte Zuckermenge	71,07%	78,31%	70,35%	78,08%
Nichtzucker	0	6,89%	0	6,22%
Asche	—	0,105%	—	0,114%
Säure, berechn. auf Ameisensäure	0	0,083%	0,078%	0,106%
Polarisation (10%ige Lösung) vor d. Inversion	—	−1,25°	—	−1,23°
Polarisation (10%ige Lösung) nach d. „	—	−2,23°	—	−2,25°
Katalase	0	0	0	0
Diastase	0	20,0 ccm	0	15,0 ccm
Invertase	0	vorhanden	0	vorhanden

und II (Honig Nr. 3 und 3a) sehen wir, daß ein merklicher Unterschied zwischen ihnen nicht besteht, ungeachtet dessen, daß die beiden ersten Proben 3 mal durch den Honigmagen der Biene hindurchgeführt wurden.

Versuch 2: Zuckersirup mit 0,3% Citronensäure wie auch 0,3% Salicylsäure. Um weiterhin den Einfluß der sauren Reaktion des Sirups auf die Zusammensetzung des Honigs zu studieren, wurde die Menge der dem Sirup zugesetzten Säure verdreifacht. Zu diesem Zwecke erhielten am 23. VIII. 1916 2 Völker je 25 Pfund mit 0,3% Citronensäure versetzten Zuckersirup, 2 andere dieselbe Menge Sirup, jedoch mit 0,3% Salicylsäure; den 31. VIII. erhielten sodann 2 Völker je 25 Pfund Sirup ohne Säurezusatz.

In jeden der Versuchsstöcke wurden 2 Rähmchen mit leeren Waben hineingestellt, wobei es beabsichtigt war, das eine Rähmchen nach 3 Tagen, gerechnet vom Augenblick der Vorsetzung des Futters, herauszunehmen, das zweite dagegen bis zur Reife des Honigs im Stocke zu belassen, d. h. so lange, bis die Bienen zum Verschluß der Waben schreiten würden. Da aber das Wetter im Versuchsjahr äußerst ungünstig war, so begannen die Bienen den in die Waben abgelegten Honig bald selbst zu verbrauchen, und es gelang nicht, reifen Honig zu erhalten; nach 8 Tagen, gerechnet von der Vorsetzung des Futters, war nur in einem der Stöcke (Sirup Nr. 8) noch ein geringer Teil Honig zurückgeblieben.

Das eine von den beiden Völkern dagegen, welches den 50 proz. Zuckersirup ohne Säurezusatz erhalten hatte, hatte ihn innerhalb des ganzen Stockes verteilt, so daß es schon nach 3 Tagen nicht mehr möglich war, eine zur Analyse genügende Menge Honig zu sammeln.

Die mit Citronensäure angesäuerte Nahrung nahmen die Bienen gern an, während sie den mit Salicylsäure versetzten Sirup verschmähten; dieser konnte nach 4 Tagen in ursprünglichem Zustande aus dem Stock genommen werden.

Die Untersuchungsresultate der erhaltenen Honigproben sind in den Tabellen III und IV dargestellt.

Tabelle III.

Bestandteile	Sirup Nr. 7. Verfüttert am 23. August 1916.	Honig Nr. 8. Von den Bienen aus Sirup Nr. 7 erzeugt. Herausgenommen am 26. August 1916.	Sirup Nr. 8. Verfüttert am 23. August 1916.	Honig Nr. 9. Von den Bienen aus Sirup Nr. 8 erzeugt. Herausgenommen am 26. August 1916.	Honig Nr. 9a. Von den Bienen aus Sirup Nr. 8 erzeugt. Herausgenommen am 31. August 1916.
Spez. Gewicht der Lösung 1 : 2 bei 15° C	1,0703	1,0810	1,0844	1,0966	1,1014
Trockensubstanz	50,97%	58,64%	60,74%	68,85%	71,97%
Wasser	49,03%	41,36%	39,26%	31,15%	28,03%
Invertzucker	0	5,23%	0	7,36%	7,89%
Rohrzucker	50,97%	53,13%	60,74%	61,33%	63,54%
Gesamte Zuckermenge	50,97%	58,36%	60,74%	68,69%	71,43%
Nichtzucker	0	0,28%	0	0,16%	0,54%
Säure, berechn. auf Ameisensäure	0,202%	0,221%	0,210%	0,212%	0,212%
Polarisation (10 proz. Lösung) vor d. Inversion	—	+7,02°	—	+8,14°	+8,25°
Polarisation (10 proz. Lösung) nach d. „	—	−2,31°	—	−2,80°	−3,12°
Katalase	0	0	0	0	0
Diastase	0	0	0	0	0
Invertase	0	?	0	?	?

Die in der Tabelle III angeführten Daten zeigen, daß zwischen der Zusammensetzung des 0,3% Citronensäure enthaltenden Sirups und des von den Bienen aus ihm erzeugten Honigs kein merklicher Unterschied besteht.

Bei genauerer Betrachtung der Honiganalysen Nr. 8, 9 und 9a sehen wir, daß die Wasserverdampfung in denselben Grenzen vor sich ging wie in den früheren Versuchen. Invertzucker hat sich in sehr geringer Menge gebildet: Probe Nr. 8 enthält 5,23% und Nr. 9 7,36%.

Ob diese Mengen Invertzucker sich unter dem Einfluß von Invertase oder unter dem der zugesetzten Säure gebildet haben, ist eine offene Frage. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist das letztere der Fall.

Charakteristisch ist auch der Umstand, daß die Menge des Invertzuckers in diesem Falle nicht wesentlich anwächst, auch

Tabelle IV.

Bestandteile	Sirup Nr. 9. (ohne Säure) Verfüttert am 31. August 1916.	Honig Nr. 10. Von den Bienen aus Sirup Nr. 9 erzeugt. Herausgenommen am 8. Septemb. 1916.
Spez. Gewicht d. Lösung 1:2 bei 15° C	1,0982	1,1064
Trockensubstanz	69,87%	75,63%
Wasser	30,13%	24,37%
Invertzucker	0	24,48%
Saccharose	69,87%	47,57%
Gesamte Zuckermenge	69,87%	72,05%
Nichtzucker	0	3,58%
Säure, berechnet auf Ameisensäure	0	0,012%
Polarisation (10%ige Lösung) vor der Inversion	—	+6,32°
Polarisation (10%ige Lösung) nach „ „	—	−2,60°
Katalase	0	0
Diastase	0	2,5 ccm
Invertase	0	vorhanden

dann nicht, wenn der Honig längere Zeit im Stocke verbleibt. So finden wir in Probe Nr. 9a, die 8 Tage im Stocke verweilt hat, einen nur um 0,53% höheren Gehalt an Invertzucker als in Probe Nr. 9, die nur 3 Tage im Stock geblieben ist.

Weiterhin fehlt in diesen Proben vollständig die Diastase, ein Anwachsen der Säure ist nicht bemerkbar, und die gefundene Menge an Nichtzucker liegt innerhalb der Analysenfehler.

Währenddessen findet sich, wie aus der Tabelle IV ersichtlich, in dem von den Bienen aus neutralem Sirup erzeugten Honig Nr. 10 eine beträchtliche Menge Invertzucker und Nichtzucker, außerdem Diastase, Invertase und eine geringe Menge Säure.

Folglich übt die dem Sirup im Betrage von 0,3% zugefügte Citronensäure eine hemmende Wirkung nicht nur auf den Inversionsprozeß aus, sondern auch auf die übrigen Vorgänge, welche wie im Honigmagen der Arbeitsbiene, so auch im Stocke während der Reifung des Honigs vor sich gehen.

Die von mir erhaltenen Daten widersprechen der unter den Bienenzüchtern herrschenden Ansicht von der Notwendigkeit eines Säurezusatzes zum Zuckersirup.

In den meisten Werken über Bienenzucht findet man die Angabe, man müsse zum Sirup, der zur Verfütterung an die Bienen bestimmt sei, irgendeine Säure hinzufügen; dabei raten einige Verfasser zur Benutzung so großer Säuremengen, die zweifellos einen schädlichen Einfluß auf den Bildungsprozeß des Honigs ausüben müssen.

Solche Nahrung muß außerdem auch einen schädlichen Einfluß auf die Biene ausüben, wobei Bienen, die eine solche Nahrung während der Winterruhe erhalten haben, zugrunde gehen, oder im Frühjahr vom Durchfall und anderen Krankheiten erheblich geschwächt sind. Damit erklären sich auch teilweise die Mißerfolge, die bei Zuckerfütterung zu verzeichnen sind[1]).

Es versteht sich von selbst, daß es grundlos wäre zu behaupten, daß eine jede, wenn auch kleinste Säuremenge einen schädlichen Einfluß auf die Bildung und Reifung des Honigs ausüben würde, um so mehr, als sowohl der Nektar wie auch der Honig eine schwachsaure Reaktion aufweisen. Doch zeigen die Resultate meiner Versuche, daß bei Verfütterung von neutralem Zuckersirup die fermentativen Prozesse völlig glatt verlaufen, während ein Überschuß an Säure unbedingt schädlich wirkt.

Jedenfalls kann man das eine mit Bestimmtheit behaupten, daß man mit dem erwähnten Säurezusatz sehr vorsichtig sein muß; im Falle der Verwendung einer solchen sollte man, meiner Meinung nach, auf jede 10 kg Sirup nicht mehr als 10 g Säure (jedoch keine Mineralsäure) nehmen.

Von Interesse ist auch der Umstand, daß die Bienen den mit Salicylsäure versetzten Sirup verschmähten, während sie den mit dem gleichen Gehalt an Citronensäure gern annahmen. Bekanntlich fügen die Bienenzüchter sehr oft bei der Erkrankung der Bienen an Faulbrut, Nosema Apis usw. Salicylsäure hinzu, in der Meinung, daß diese Säure, wenn sie mit der Nahrung in den Organismus der Biene eingeführt wird, die pathogenen Bakterien töte. Doch ist diese Ansicht schwach begründet. Die Salicylsäure ist wohl giftig, hat jedoch schwache desinfizierende Eigenschaften; sie wird in der angewandten Konzentration wohl kaum irgendeine bactericide Wirkung ausüben können.

Auf Grund der vorliegenden Resultate muß man schließen, daß die dem Zuckersirup im Überschuß zugesetzte Säure alle bei der Bildung und Reifung des Honigs vor sich gehenden biochemischen Prozesse unterdrückt.

[1]) Sarin, E., Beiträge zur Inversion des Rohrzuckers mittels Säuren (russ.). Arb. a. d. Landw.-bakt. Labor. d. Ackerbauminist. Petersburg 1912, S. 11.

Nachweis und Bestimmung des Morphins und anderer Alkaloide in tierischen Ausscheidungen und Organen.

Von

Curt Wachtel.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 13. Mai 1921.)

Die Frage nach dem Schicksal des Morphins im tierischen Organismus ist wiederholt in Angriff genommen worden. Die Brauchbarkeit der Ergebnisse hängt von dem angewandten Verfahren der Morphinbestimmung ab. Um die Genauigkeit der bisher verwendeten Methoden zur quantitativen Bestimmung des Morphins in tierischen Organen und Exkreten zu erörtern, ist es zweckmäßig, zwischen der Isolierung des Morphins aus den organischen Flüssigkeiten einerseits und der Bestimmung des isolierten Morphins andererseits zu unterscheiden und die diesen beiden Zwecken dienenden Verfahren einer getrennten Besprechung zu unterziehen.

Die quantitative Bestimmung des isolierten Morphins hängt von der Art der vorangegangenen Isolierung ab.

Entweder wird das als freie Base isolierte Morphin als solches gewogen oder durch Titration der Säuremenge, die sie zu binden vermag, nach den Verfahren von Falieres[1]), Christensen[2]), Volhard[3]) ermittelt.

Zur 2. Gruppe gehören die Fällungsmethoden des Morphins mit Pikrolonsäure nach Mattke und Ramstedt[4]), mit Silicowolframsäure nach Bertrand[5]), mit Jodjodkalium nach Gordin[6]), mit Quecksilberjodidjodkalium nach Mayer[7]), bei denen das Morphin durch Wägung des M-haltigen Niederschlages bestimmt wird. Die jodometrische Bestimmung des Morphins mittels des aus Jodsäure ausgeschiedenen Jods oder mit Verwendung der Marquisschen Reaktion erwies sich in den Händen verschiedener Forscher als unzuverlässig[8], [9]).

Alle angeführten Methoden geben nur dann zuverlässige Resultate, wenn man in der morphinhaltigen Lösung alle störenden

Substanzen ausgeschieden hat. Dies ist jedoch bei den bisher üblichen Isolierungsmethoden keineswegs immer der Fall.

Alle bisher gebrauchten Isolierungsmethoden beruhen auf dem Prinzip, das Marquis[10]) und Tauber[11]) benützt haben: Extraktion der M-haltigen Organe mit saurem Wasser oder Alkohol, Reinigung des Extraktes durch Fällung mit basischem Bleiacetat und Ausschüttelung bei ammoniakalischer Reaktion. Alle beschriebenen Modifikationen wie die von Russwurm[12]), van Rijn[13]), Rübsamen[14]), Gottlieb[15]), Cloetta[16]), v. Kauffmann-Asser[17]) und Kenzo Tamura[18]) bestehen entweder in verschiedener Wahl von Ausschüttelungsmitteln oder in der Einschaltung besonderer, der Reinigung des Morphins dienender Manipulationen. Daneben ist die Sorgfalt der einzelnen Forscher oft wesentlich ausschlaggebend für die Güte der Resultate gewesen.

Alle vorgeschlagenen Modifikationen haben jedoch die im Prinzip der Ausschüttelungsmethode begründeten Mängel (große Volumina, lange Zeitdauer) nicht beseitigen können. Schon ihre große Zahl ist ein Beweis dafür.

Der Hauptmangel der Ausschüttelungsverfahren besteht darin, daß die Ausschüttelung keine Gewähr für eine vollständige Isolierung und Reinheit des Morphins bietet. So besteht bei der Tauberschen Methode die Möglichkeit, daß Kalziumsalze in die morphinhaltige Lösung mit eingehen, aus welcher jene dann mit dem $NaHCO_3$ als $CaCO_3$ ausgefällt werden und bei der Wägung des Morphins dessen Gewicht vermehren[18a]). Je mehr Reinigungsmanipulationen eingeschaltet werden, um so größer werden natürlich die Verluste an Morphin. Die Untersuchungen von v. Kauffmann-Asser aus jüngster Zeit arbeiten unter diesen Umständen, trotz der großen Sorgfalt, mit der die Analysen ausgeführt worden waren, nach den eignen Kontrollanalysen des Verfassers mit einem Fehler von 30%. Hiernach darf wohl die Annahme berechtigt erscheinen, daß die Angaben älterer Untersucher, wonach dieselben mit ihren fehlerhafteren Methoden bessere Analysenresultate gehabt haben wollen, auf unerkannt gebliebenen Fehlerquellen beruhen.

Überdies besteht gegen alle diese Methoden der Einwand, daß sie überaus umständlich und zeitraubend sind. Cloetta[19]) gibt beispielsweise selbst an, daß man nach seiner Methode bei Übung immerhin eine Analyse in 14 Tagen fertig bringen kann. Andererseits erfordert jede Bestimmung nach Gottlieb-Rübsamen den Verbrauch von 2—3 Litern Chloroform.

Unter diesen Umständen ist es kein Wunder, daß die mit diesen Methoden untersuchten biologischen Fragen von verschiedenen Forschern zum Teil ganz verschieden beantwortet worden sind. Bevor man an eine erneute Untersuchung über das Schicksal des Morphins im tierischen Organismus heranging, mußte deshalb eine genauere und leichter durchführbare Methode zur Isolierung und Bestimmung des Morphins gesucht werden. Maßgebend für die Richtung, in welcher diese zu suchen war, waren die Gesichtspunkte, die sich aus der vorangehenden Übersicht ergeben, nämlich erstens ein einfacheres Isolierungsverfahren zu finden, welches gestattet, die Ausschüttelung zu vermeiden und Fällungsreaktionen an ihre Stelle zu setzen, und zweitens das Morphin hinterher durch eine charakteristische Reaktion zu bestimmen. Eine Methode, welche diese Forderungen erfüllt, wird im experimentellen Teile beschrieben werden.

Eine Anwendung hat die Methode sodann bei der Bestimmung des Morphins im Harn und Kot von akut vergifteten und morphingewöhnten Hunden gefunden, worüber in der vorliegenden Mitteilung berichtet wird. Ferner wird über einige weitere Versuche, die das Schicksal des Morphins im tierischen Organismus betreffen, berichtet werden.

Von den älteren Bestimmungen der M-Ausscheidung müssen diejenigen von Tauber[20]) und Faust[21]) erwähnt werden, welche mit einer identischen Methode ausgeführt wurden. Tauber fand z. B. in den Faeces eines Hundes, der 1,632 g Morphin im Laufe von 10 Tagen erhalten hatte, 0,572 g wieder. Faust hat gefunden, daß die im Kot von morphingewöhnten Hunden ausgeschiedenen Morphinmengen bei fortschreitender Gewöhnung immer geringer werden und schließt daraus, daß der Organismus bei fortgesetzter Einverleibung von M immer mehr die Fähigkeit erlangt, das M zu zerstören.

Spätere Forscher fanden jedoch, daß das Alkaloid im Harn in größeren Mengen ausgeschieden wird. v. Kauffmann-Asser fand, daß Kaninchen und Hunde subcutan injiziertes Morphin im Harn in wechselnden Mengen, jedoch frühestens vom 2. oder 3. Tage nach der ersten Injektion an ausscheiden. Die wiedergefundenen Mengen betrugen 1,5—30% der einverleibten. Bei einem morphingewöhnten Kaninchen stiegen die im Harn wiedergefundenen M-Mengen zunächst stark an, 5—39% der in den dem Versuch vorhergehenden 48 Stunden injizierten Morhpinmenge, und fielen dann wieder auf etwa 10—13% während einer längeren Periode. Die Gesamtmenge des im Harn ausgeschiedenen Morphins soll nach

v. Kauffmann-Asser 15—20% betragen. In den Faeces fand dieser Forscher nur sehr geringe Mengen Morphin wieder (10 mg in den Faeces von 24 Stunden nach 19tägiger Gewöhnung).

Kenzo Tamura[18]) fand bei Hunden von einer einmal injizierten Dosis von 0,2 g $^1/_3$—$^1/_4$ derselben im Kot, im Harn nur Spuren wieder. Bei gewöhnten Hunden nimmt der Morphingehalt des Kotes im Verlauf der Gewöhnung ab, dafür steigt jedoch derjenige des Harns, so daß die Gesamtausscheidung während der ganzen Dauer der Gewöhnung etwa gleichbleibt. Schließlich fand Tamura auch bei akuter Vergiftung bei genügend großer Dosis (0,8 g) etwa 5% derselben im Harn wieder.

Die Ergebnisse von v. Kauffmann-Asser und Kenzo Tamura stehen im Gegensatz zu denen von Faust, zum Teil auch untereinander. So hat v. Kauffmann-Asser die Morphinausscheidung im Harn beim Dauerversuch am Hunde nicht beobachtet. Überdies sind die Untersuchungen von Kenzo Tamura in der Weise angestellt, daß meist Kot und Harn mehrerer Tage gemeinsam analysiert wurden, so daß ein ganz klares Bild der Ausscheidungskurve nicht vorliegt. Schließlich sind gegen die Methode Kenzo Tamura und v. Kauffmann-Asser dieselben Einwände zu erheben, wie gegen alle Ausschüttelungsverfahren.

Morphingewöhnte Hunde standen mir im Institut gelegentlich anderer Untersuchungen zur Verfügung, so daß die Bestimmungen über die Ausscheidung an denselben zuerst zur Einübung und Prüfung der neuen Methodik benutzt wurden.

I.

Die Versuche, zu einer einfacheren und kürzeren Methodik zu gelangen, gingen von der Absicht aus, die Entstehung von Oxydimorphin durch Einwirkung von Kaliumferricyanid bei alkalischer Reaktion, welche nach folgender Gleichung vor sich geht:

$$2\,C_{17}H_{19}NO_3 + 2\,KOH + 2\,K_3FeCy_6 = (C_{17}H_{18}NO_3) + 2\,H_2O + 2\,K_4FeCy_6$$

für die quantitative Bestimmung des Morphins zu verwenden, zumal da diese Reaktion noch mit sehr kleinen Mengen von Morphin angestellt werden kann.

Wünschenswert erschien eine Methode, welche gestattet, das Morphin durch eine Fällungsreaktion aus dem Harn zu isolieren.

Durch Fällung mit basischen Bleiacetat kann man normalen Harn von Hunden, Kaninchen und Menschen soweit reinigen, daß

er mit Tannin keinen Niederschlag mehr gibt und etwa vorhandenes Morphin demnach durch Fällung mit Gerbsäure isoliert werden könnte. Jedoch bereitete die Zersetzung des gerbsauren Morphins erhebliche Schwierigkeiten, so daß fernerhin Versuche mit der zum Alkaloidnachweis gebräuchlichen Phosphorwolframsäure unternommen wurden, welche unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure dargestellt wird. Diese Versuche führten deswegen zu keinem Ziel, weil diese Phosphorwolframsäure soviel verschiedene Stoffe aus dem Harn niederschlägt, daß es nicht möglich war, eine Reinigung des Harns vorzunehmen, nach welcher das Morphin als einziger mit der Phosphorwolframsäure ausfallender Stoff zurückblieb.

Es lag nun nahe, so vorzugehen, daß man die Empfindlichkeit der Phosphorwolframsäure für andere Substanzen in der Weise herabsetzte, daß man den Salzsäurezusatz zu derselben vermied. Auf diese Weise konnte eine Methode ausgearbeitet werden, welche auf folgendem Prinzip beruht.

Prinzip.

Der Harn wird mit Schwefelsäure eben angesäuert und mit basischem Bleiacetat gefällt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und darauf bei schwachsaurer Reaktion mit einer salzsäurefreien Phosphorwolframsäure das Morphin ausgefällt. Dieser Niederschlag von phosphorwolframsaurem Morphium wird gewaschen, in verdünnter Natronlauge gelöst und mit Seignettesalz zersetzt, wobei Wolframoxyde ausfallen. In dieser Lösung, welche außer phosphorsaurem Morphin nur noch Seignettesalz und weinsaures Natron enthält, konnte das Morphin mit Ferricyankalium zu Oxydimorphin oxydiert werden. Durch jodometrische Bestimmung des zur Oxydation verbrauchten Ferricyankaliums wird die Menge des vorhandenen Morphins ermittelt.

Die einzelnen Phasen dieser Methode erfordern die Innehaltung einer Reihe von Bedingungen, welche in der folgenden Beschreibung mitgeteilt werden.

Reinigung des Harns mit basischem Bleiacetat.

Der ausgeschiedene Harn von Menschen, Hunden oder Kaninchen wird mit Schwefelsäure ganz schwach angesäuert und darauf mit käuflichem Bleiessig (Liqu. Plumb. subacet. D. A. B. 5) versetzt.

Für 100 ccm Harn genügen im allgemeinen je 10 ccm Bleiessig. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit viel Wasser gewaschen, Filtrat und Waschwasser vereinigt und mit Schwefelwasserstoff entbleit, von dem abgeschiedenen Schwefelblei abfiltriert und auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens eingeengt. Der so gereinigte Harn gibt, wenn er kein Morphin enthält, mit der Phosphorwolframsäure unter den folgenden Bedingungen keinen Niederschlag mehr. Das eingeengte Filtrat wird mit Natronlauge zunächst schwach alkalisch gemacht und darauf mit 25 proz. Phosphorsäure schwach angesäuert, zum Sieden erhitzt und wenn nötig filtriert. Setzt man nunmehr zu 20 ccm des eingeengten kalten Filtrats, welche 200 ccm des ursprünglichen Harns entsprechen, 2—3 ccm Phosphorwolframsäure, so entsteht keinerlei Niederschlag, erst nach 16—24 Stunden kann man eine geringe Trübung beobachten. Es ist also erforderlich, einen Überschuß von Phosphorsäure oder Mineralsäure zu vermeiden und nicht viel mehr Phosphorwolframsäure zu verwenden als zur Fällung des vorhandenen Morphins erforderlich ist. Diese Bedingungen lassen sich bei einiger Aufmerksamkeit in allen Fällen leicht innehalten.

Fällung des Morphins mit Phosphorwolframsäure.

Die verwendete Phosphorwolframsäure wird in der Weise dargestellt, daß 50 g wolframsaures Natrium (Kahlbaum) in 300 ccm 25 proz. Phosphorsäure unter Erwärmen gelöst werden[25]). Mit dieser Phosphorwolframsäure gelingt es, das Morphin aus wässriger Lösung noch in einer Verdünnung von 1 : 10000 als einen flockigen filtrierbaren Niederschlag auszufällen. Löst man in 5 ccm des auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens eingeengten und entbleiten Harnfiltrats 0,5 mg Morphinum hydrochloricum, so entsteht bei Zusatz von $^1/_2$ ccm Phosphorwolframsäure ein Niederschlag, welcher sich bald flockig zu Boden setzt. Auf diese Weise ist es also möglich, 0,01 g Morphin in 1 Liter ursprünglichen Harns mit Sicherheit nachzuweisen.

Hat man auf diese Weise das Morphin ausgefällt, so läßt man den Niederschlag absetzen, gießt die überstehende Flüssigkeit ab und wäscht den Niederschlag durch mehrmaliges Aufgießen von destilliertem Wasser und Dekantieren gut aus, wobei man zur besseren Ausflockung dem Waschwasser jedesmal einige Tropfen Phosphorsäure zufügen kann.

Zersetzung des phosphorwolframsauren Morphins.

Die Zersetzung des phosphorwolframsauren Morphins könnte in der für diese Niederschläge üblichen Weise durch Verreiben mit Bariumhydroxyd geschehen. Für den vorliegenden Fall wurde von dieser Methode abgegangen, da das Einbringen des Niederschlages in eine Reibschale und die Entfernung des überschüssigen Bariums nicht ohne Schwierigkeiten quantitativ ausführbar ist und eine Methode, bei welcher man derartige Manipulationen vermeiden kann, entschieden vorgezogen werden mußte. Als zweckmäßigstes Verfahren, welches zugleich die günstigsten Vorbedingungen für die spätere Titration schafft, ergab sich das folgende.

Der gewaschene Niederschlag von phosphorwolframsaurem Morphin wird in möglichst wenig Wasser aufgeschwemmt und mit soviel Natronlauge versetzt, daß er sich eben mit tiefblauer Farbe vollständig auflöst. In diese Lösung wird gepulvertes Seignettesalz in Substanz bis zur Sättigung unter Erwärmen eingetragen und zum Sieden erhitzt, darauf wird die Lösung, welche durch die beginnende Ausscheidung von Wolframoxyden bereits getrübt ist, in einen Meßzylinder von passender Größe übergefüllt und im Thermostaten bei 40° einige Zeit stehengelassen. Nach spätestens 6 Stunden ist die Zersetzung des phosphorwolframsauren Morphins beendet. Man erkennt dies daran, daß die über dem als Bodenkörper ausgefallenen Wolframoxyd befindliche Lösung auf Schwefelsäurezusatz keinen Niederschlag mehr gibt.

Titration des Morphins:

Die Oxydimorphinreaktion [22]) geht nach folgender Gleichung vor sich:

$$2C_{17}H_{19}NO_3 + 2KOH + 2K_3FeCy_6 = (C_{17}H_{18}NO_3)_2 + 2H_2O + 2K_4FeCy_6.$$

Setzt man zu einer verdünnten Morphinlösung ein Krystallsplitterchen Ferricyankalium, erwärmt und fügt vorsichtig verdünntes Ammoniak hinzu, so scheidet sich alsbald das Oxydimorphin als ein schön krystallinischer Niederschlag ab.

Versuche, welche bei der Ausarbeitung der Titration angestellt wurden, zeigten, daß je nach dem Grade der Alkalescenz die Reaktion im Sinne obiger Gleichung entweder unvollständig verläuft, oder aber, wenn man zuviel Ammoniak zusetzt, eine weitergehende Oxydation eintritt, wobei anscheinend der neu entstehende Körper leichter löslich ist als das Oxydimorphin und da auch dieses

letztere in einem Überschuß von Ammoniak sich auflöst, die nephelometrische Bestimmung, welche ohnehin nur ein Notbehelf gewesen wäre, hierdurch völlig in Frage gestellt wurde. Hiermit sind zugleich die Schwierigkeiten angedeutet, welche bei der Ausarbeitung der Methode überwunden werden mußten.

Um bei der Titration immer den gleichen Grad von Alkalescenz zu erreichen, wurde folgender Kunstgriff angewendet. Die Morphinlösung wird zunächst mit Seignettesalz gesättigt, hierauf einige Tropfen Weinsäure bis zur sauren Reaktion zugesetzt, sodann wird die überschüssige Weinsäure durch Bariumcarbonat neutralisiert. Hierdurch wird erreicht, daß die vorhandene Alkalimenge zunächst neutralisiert wird. Nach dem Zusatz von $BaCO_3$ ist die Lösung sodann mit weinsaurem Alkali und einer kleinen Menge weinsauren Bariums gesättigt. Die durch die hydrolytische Spaltung dieser Salze bedingte Alkalescenz hat naturgemäß immer einen bestimmten gleich großen Betrag, welcher gerade für den richtigen Verlauf der Reaktion notwendig ist und der infolge der Gegenwart von überschüssigem $BaCO_3$ im Verlaufe der ganzen Reaktion nicht verändert werden kann. Zu dieser Lösung wird eine abgemessene Menge $^n/_{100}$ Ferricyankaliumlösung[23]) hinzugefügt und nunmehr das ganze Reaktionsgemisch auf 60° C erwärmt und in einem Wasserbade von 60° C eine halbe Stunde lang stehengelassen. Danach läßt man es 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, bevor die Titration beginnt. Nun fügt man 1 ccm 5 proz. Jodkaliumlösung und einige Tropfen Stärkelösung zu und titriert mit $^n/_{100}$-Natriumthiosulfat das unverbrauchte Ferricyankalium zurück. Aus der Differenz ergibt sich die gesuchte Morphinmenge, indem 1 ccm $^n/_{100}$-Ferricyankaliumlösung 3,758 mg salzsauren Morphins (mit 3 Molekülen Krystallwasser) entspricht.

Bei Gegenwart von Seignettesalz und Bariumcarbonat mußte die Oxydimorphinreaktion nach der folgenden Gleichung verlaufen:

$$2\,C_{17}H_{19}NO_3 + K_2C_4H_4O_6 + 2\,K_3FeCy_6 + BaCO_3$$
$$= (C_{17}H_{18}NO_3)_2 + BaC_4H_4O_6 + 2\,K_4FeCy_6 + CO_2 + H_2O\,.$$

Die hydrolytische Spaltung des Seignettesalzes liefert unter diesen Bedingungen gerade die zur Einleitung und Beendigung der Oxydimorphinreaktion notwendige Alkalescenz. Weicht man von diesen Verhältnissen ab, so erhält man bei zu niedrigem Alkalizusatz zu niedrige Resultate, indem die Reaktion nicht zu Ende verläuft. Fügt man zuviel Alkali hinzu, so verläuft die Reaktion

weiter und liefert zu hohe Zahlen, wie aus der nachfolgenden Tabelle hervorgeht.

In diesem Versuch wurden zu je 50 mg Morphin hydrochl. in 5 ccm Wasser je 3 ccm $^n/_{10}$-Ferricyankaliumlösung hinzugefügt mit Seignettesalz gesättigt, nicht ganz zum Sieden erhitzt und die in der Tabelle angegebene Menge einer verdünnten Ammoniaklösung zugesetzt. Die Zahlen bezeichnen die bei der Titration verbrauchten ccm $^n/_{10}$-Natriumthiosulfatlösung:

	ohne NH_3	+ 1 gtt.	+ 3 gtt.	+ 5 gtt.	NH_3 berechnet
sofort titriert . .	0,9	1,0	1,0	1,6	1,4 ccm
nach $^1/_2$ Stde. .	0,9	1,0	1,5	2,0	1,4 „
nach 16 Stdn. .	1,1	1,2	1,5	2,7	1,4 „

Man ersieht aus der Tabelle zugleich, daß die Reaktion, wenn die Alkalescenz richtig getroffen ist wie in der dritten Spalte, auch nach 16 Stunden nicht wesentlich weiter als bis zur Bildung des Oxydimorphins fortgeschritten ist. Ferner lehrt der Versuch, daß die Art des Erhitzens von erheblichem Belang für den Verlauf der Reaktion ist. Erhitzt man nämlich wie in diesem Versuch nicht zum Sieden, so geht die Oxydation bei zu geringem Alkaligehalt auch in langer Zeit nicht zu Ende. Bei zu hohem Alkaligehalt überschreitet sie dagegen die Grenze auch ohne daß zum Sieden erhitzt worden ist.

Hält man jedoch die beschriebenen Bedingungen, d. h. den Zusatz von Weinsäure und Bariumcarbonat ein, so verläuft die Reaktion gerade bis zur vollständigen Bildung des Oxydimorphins, wie der nachstehende Versuch zeigt. Acht Proben, welche je 10 mg Morph. hydrochl. enthielten, wurden nach dem Erhitzen mit $^n/_{100}$-Ferricyankalium und Bariumcarbonat stehengelassen und nach der in Spalte 1 angegebenen Zeit titriert.

Es wurden gefunden:

Nach $^1/_2$ Stunde . . .	11,19	und	11,84	mg	M. hydrochl.
„ 1 „ . . .			9,33	„	„ „
„ $1^1/_2$ Stunden . .	11,19	„	10,59	„	„ „
„ 2 „ . .	11,19	„	11,51	„	„ „
„ 3 „ . .			10,91	„	„ „

Zehn Proben, welche je 20 mg Morphium hydrochloricum enthielten, wurden nach der Vorschrift analysiert und ergaben folgende Resultate: es wurden wiedergefunden

					im Mittel
20,27	21,17	18,66	19,63	22,78 mg	20,09 mg.
19,31	18,66	18,67	19,31	22,52 „	

Die größte Abweichung beträgt demnach 13,9%, der mittlere Fehler 0,5%.

Einige weitere Beleganalysen seien noch angeführt: so würden z. B. wiedergefunden von 50 mg Morph. hydrochl. in wässeriger Lösung:

49,04	50,29	50,78	48,40	49,49	49,17
anstatt 20 mg:		19,05	20,59		
„ 30 „		29,54			
„ 40 „		40,20			
		anstatt 15 mg:	14,70		
		„ 25 „	23,75		

Da die Methode zunächst für die Auffindung des Morphins im Harn und in den Organen Verwendung finden sollte, so ist sie für die hier zu erwartenden kleinen Mengen ausgearbeitet worden. Bei einer zu bestimmenden Morphinmenge von 10—20 mg betragen die Fehler, mit denen man zu rechnen hat, wie aus den vorstehenden Tabellen hervorgeht, absolut 1—2 mg. Bei kleineren Mengen als 10 mg Morphin, von 5 mg abwärts, findet man zu hohe Morphinwerte, so daß die Methode hier in dieser Gestalt nicht mehr anwendbar ist. Für wesentlich höhere Mengen als etwa 50 mg beträgt der Fehler ebenfalls etwa 10—20%. Bei der praktischen Bestimmung des Morphins im Harn ist es deshalb in allen Fällen, wo größere Mengen vorliegen, zweckmäßig, die Titration in einem aliquoten Teil auszuführen: man hat hierbei zugleich den Vorteil, daß man mehrere Parallelbestimmungen ausführen und auf diese Weise mit größerer Sicherheit arbeiten kann. Bei der Bestimmung im Harn käme als weitere Fehlerquelle in Betracht, daß der Bleiniederschlag einen Teil des im Harn enthaltenen Morphins durch Adsorption mitreißen kann. Dieser Fehler ist aber gering, wenn man den Bleiniederschlag sorfältig auswäscht, bis in dem Filtrat mit Fröhdes oder Marquis Reagens kein Morphin mehr nachweisbar ist. Besonders gründlich wirkt heißer Alkohol als Waschflüssigkeit. Aus den weiter unten angeführten Beleganalysen geht übrigens hervor, daß diese Fehlerquelle ebenso wie die folgenden keinen erheblichen Einfluß auf das Resultat hat.

Die Fällung des Morphins mit Phosphorwolframsäure, die, wie bereits bemerkt, in einer reinen wässrigen Morphinlösung in Verdünnung 1 : 10000 absolut zuverlässig ist, verursacht keine Verluste. Nehmen wir an, 500 ccm Harn enthielten 5 mg Morphin,

so befinden sich diese 5 mg nach dem Entbleien und Einengen des Filtrates in 50 ccm Flüssigkeit, welche noch dazu mit Salzen annähernd gesättigt ist, so daß an dieser Stelle ein berechenbarer Fehler nicht in den Versuch eingeht, da die Phosphorwolframsäurefällung in einer gesättigten Salzlösung empfindlicher ist, als in rein wässeriger Lösung. In dieser Verdünnung von 1 : 1000 kann man auf eine vollständige Ausfällung des Morphins rechnen.

Da im übrigen alle Manipulationen bis zum Beginn der Titration bei saurer Reaktion vor sich gehen, so ist durch das Einengen des Harnes auf dem Wasserbade sowie durch das etwaige Stehen desselben an der Luft während des Ganges der Untersuchung kein Verlust zu erwarten.

Bei raschem Arbeiten ist es möglich, eine Bestimmung in $1^1/_2$ Tagen zu beenden und mehrere Bestimmungen nebeneinander vorzunehmen, während die bisher gebräuchlichen Methoden bei weitem längere Versuchszeiten erfordern, die sich über Wochen erstrecken. Durch diese Verkürzung der Versuchsdauer wird auch die Möglichkeit von Verlusten durch Oxydation und dergleichen während des Verlaufs der Untersuchung wesentlich eingeschränkt.

Aus Versuchen, bei denen dem Harn eines normalen Hundes Morphin zugesetzt worden war, geht hervor, daß der Fehler bei der gesamten Bestimmung höchstens 10—20% beträgt. Um schließlich eine genaue Vorstellung vom Verlauf einer solchen Morphinbestimmung im Zusammenhange zu geben, sei hier nach einem Versuchsprotokoll vom 16. VI. 20 der Gang einer Analyse wiedergegeben.

500 ccm Harn eines normalen Hundes, welchem 50 mg Morphinum hydrochloricum zugesetzt worden sind, werden mit Schwefelsäure schwach angesäuert und mit 50 ccm Liquor plumbi subacetici versetzt. Man läßt den Niederschlag absitzen, dekantiert, wäscht 3 mal durch Aufgießen von destilliertem Wasser und Dekantieren und gibt schließlich den Bleiniederschlag mit dem letzten Waschwasser auf ein Filter. Filtrat und Waschwasser werden nunmehr durch Einleiten von H_2S von dem überschüssigen Blei befreit, das ausgeschiedene Schwefelblei abfiltriert, das Filtrat auf dem Wasserbade vom Schwefelwasserstoff befreit und auf 50 ccm eingeengt. Nun wird durch Zusatz von einigen Tropfen

Natronlauge die vorhandene Säure neutralisiert und sofort mit 25 proz. Phosphorsäure eben angesäuert.

In die erkaltete Lösung werden 5 ccm der 10 proz. Phosphorwolframsäure gegeben und sogleich mit destilliertem Wasser auf etwa 200 ccm aufgefüllt. Man wartet bis der Niederschlag sich gut zu Boden gesetzt hat, gießt die überstehende Flüssigkeit ab, wäscht noch 2—3 mal in der gleichen Weise mit destilliertem Wasser aus, dem man so viel Phosphorsäure zusetzt, daß der Niederschlag sich immer gut zu Boden setzt (meist genügen hierzu 20—30 Tropfen) und gießt das letzte Waschwasser ab. Zu dem in höchstens 10 bis 20 ccm Wasser aufgeschwemmten Niederschlage werden einige Tropfen Natronlauge hinzugefügt, bis der Niederschlag sich grade mit tief blauer Farbe löst, Seignettesalz bis beinahe zur Sättigung hineingegeben, zum Sieden erhitzt, in einem Meßzylinder auf 35 ccm aufgefüllt und 4—6 Stunden in einem Thermostaten bei einer Temperatur von 40—50° C stehengelassen. Nach dieser Zeit wurden 19 ccm entnommen, mittels einer Pipette in einen Erlenmeyerkolben von 200 ccm überführt, tropfenweise 10 proz. Weinsäurelösung bis zur eben sauren Reaktion zugefügt, bis zum Sieden erwärmt, hierauf wurde eine Messerspitze Bariumcarbonat hineingegeben und 10 ccm $^n/_{100}$-Ferricyankaliumlösung aus einer Bürette zugesetzt. Nun wird noch einmal mit eingetauchtem Thermometer auf freier Flamme auf 60° erwärmt und in ein Wasserbad von gleicher Temperatur während 30 Minuten gestellt. Dann läßt man eine halbe Stunde stehen, fügt 1 ccm 5 proz. Jodkaliumlösung, konzentrierte Salzsäure in großem Überschuß und einige Tropfen Stärkelösung hinzu und titriert mit $^n/_{100}$-Natriumthiosulfat zurück, bis die blaue Farbe für die Dauer von mindestens 5 Minuten verschwindet. Verbraucht wurden 7,75 ccm $^n/_{100}$-K_3FeCy_6 = 29,13 mg Morph. hydrochl. in 19 ccm der Lösung, in den ganzen 35 ccm also entsprechend im Ganzen 53,60 mg Morph. hydrochl.

Man kann den Gang der Untersuchung beschleunigen, wenn man jedesmal anstatt zu filtrieren, in einem Meßzylinder die Niederschläge absitzen läßt, die überstehende Flüssigkeit abgießt, den Verlust feststellt und bei der endgültigen Berechnung entsprechend berücksichtigt. Man kann dann bequem in einem bis höchstens anderthalb Tagen eine Bestimmung zu Ende führen.

II. Ausscheidung des Morphins.

Für die Versuche wurden Hunde ausgewählt, welche auf Morphin nicht erbrachen. Die Versuche dienten in erster Linie der Prüfung der Methode und ihrer Ausbildung. Sie stellen insofern eine Ergänzung der Versuche von Kenzo Tamura dar, als jede Tagesmenge Harn und Kot vom ersten Versuchstage an, einzeln untersucht wurde, während Tamura meist die Ausscheidungsprodukte mehrerer Tage zusammen nahm.

Versuch 1: wurde an einem Hund von 12 700 g Körpergewicht angestellt. Die Dosis wurde jedesmal erhöht, sobald keine schlaferzeugende Wirkung mehr erreicht wurde.

Tag	Injiz. Menge g M. hydrochl. subcutan	Im Harn g M. hydrochl.	Bemerkungen
11. VI. 1920	0,12		
12. VI. „	0,12	0,0045	
13. VI. „	0,12	0,0103	
14. VII. „	0,60	0,0025	
16. VII. „	0,64	0,0759	
20. VII. „	0,72	0,0686	
22. VII. „			20 ccm abgekochte Milch subcutan
23. VII. „	0,72	0,1665	
25. VII. „	0,72	0,1345	
26. VII. „	0,72	0,0678	
28. VII. „	0,72	—	
30. VII. „	0,72	0,1138	
2. VIII. „	0,72	0,0596	
4. VIII. „	0,72	0,0229	
6. VIII. „	0,72	0,0146	
9. VIII. „	0,72	0,0388	
10. VIII. „	0,72	0,0838	

Der Versuch zeigt, daß schon am 2. Tage der Morphindarreichung eine merkliche Menge im Harn ausgeschieden wird, welche am 3. Versuchstage bereits etwa 10% der injizierten Tagesdosis beträgt. Dieser Wert wird im weiteren Verlauf des Versuches annähernd beibehalten, doch treten sehr große Schwankungen an einzelnen Tagen auf, z. B. 14. VII., 28. VII. Am 22. VII. 20 erhielt der Hund 20 ccm abgekochte Ziegenmilch subcutan. Die Begründung dieser Maßnahme erfolgt in einer eigenen Mitteilung von Joh. Biberfeld aus unserem Institute.

Versuch 2: Hund von 11 500 g. Bedingungen wie vorher

Tag	Menge injiziert	M. hydrochl. in Gramm im Harn	im Kot
2. VIII. 1920	0,1		
8. VIII. „	0,2	0,0443	
12. VIII. „	0,2	0,1142	
17. IX. „	0,4	0,0501	0,0793
19. IX. „	0,4	0,0463	0,0574
12. IX. „	0,4	0,0786	
23. IX. „	0,32		
27. IX. „	—	+	0,0100
28. IX. „	—	+	0,0764
29. IX. „	—	+	0,0437
4. X. „	—	0	

Der Versuch zeigt, daß diesmal am 6. Tage der Darreichung erhebliche Morphinmengen durch die Nieren ausgeschieden werden. Nach Absetzen der Morphingaben verschwindet das Morphin sehr schnell aus dem Harn, wird dagegen im Kot noch längere Zeit ausgeschieden.

Versuch 3: Hund von 7700 g.

Tag	Menge injiziert	M. hydrochl. in Gramm im Harn
4. X. 1920	0,1	0
5. X. „	0,15	Spur
6. X. „	0,20	0,0422

Der Versuch bestätigt den Befund von Versuch 1.

Versuch 4: Derselbe Hund wie in Versuch 3 erhält eine einmalige Injektion von 0,3 g M. hydrochl. in 4 proz. Lösung subcutan am 29. XI. 1920. Am folgenden Tage kein Kot und Harn, darauf Diarrhöe. Kot und Harn der 3 folgenden Tage bis zum 2. XII. 1920 werden gemeinsam in 2 Portionen auf M. untersucht. Am 3. XII. 1920 in Harn und Kot kein Morphin mehr vorhanden. Insgesamt wurden wiedergefunden 0,0338 g Morph. pur., d. s. 14,87% der injizierten Dosis.

Die Morphinausscheidung scheint also so zu verlaufen, daß bei dauernder Einverleibung die Gesamtmenge des im Kot und Harn ausgeschiedenen Morphins etwa $^1/_4$ der injizierten Dosis beträgt und sich im weiteren Verlauf der Gewöhnung nicht wesentlich ändert.

Von dieser Menge findet sich der größere Teil im Kot. Versuch 2 zeigt, daß die Ausscheidung im Kot noch andauert, nachdem mit der Morphinzufuhr aufgehört worden ist. Demnach besteht die

Möglichkeit, daß der Organismus des Hundes das Morphin bis zu einem gewissen Grade zu speichern vermag.

Die im Harn ausgeschiedene Morphinmenge beträgt vom 3. Tage ab etwa den 10. Teil der injizierten Menge und scheint diesen Wert beim Hunde (24) annähernd beizubehalten, solange Morphin gespeichert wird. In Verbindung mit der Tatsache, daß Morphin gespeichert wird, hat man sich also vorzustellen, daß bei dauernder Morphinzuführung sehr bald eine gewisse Morphin-Konzentration in den Organen eintritt, welche den Übergang des Alkaloid ins Blut und demgemäß seine Ausscheidung durch die Nieren ermöglicht. Bei einmaliger Zufuhr sind sehr hohe Dosen (Tamura) notwendig, um die Ausscheidung im Harn herbeizuführen.

Auch bei einmaliger Zufuhr einer großen Morphindosis beträgt die Gesamtsauscheidung nicht mehr als am Ende der Gewöhnung.

Die Fragen, welche sich aus diesen Tatsachen ergeben, betreffen nun noch das verschwundene Morphin. Zu welchem Körper ist dieses umgewandelt worden, in welchem Organ findet diese Umwandlung statt, in welcher Weise werden die Umwandlungsprodukte ausgeschieden? Es besteht die Aussicht, mit Hilfe der beschriebenen Bestimmungsmethode wenigstens auf einen Teil dieser Fragen Antwort zu finden.

III. Bestimmung des Morphins in den Organen und die Verteilung im tierischen Körper.

Die Bestimmung des Morphins in den Organen von Kaninchen geschieht analog derjenigen im Harn.

Die Organe werden zerkleinert mit Alkohol, der mit H_2SO_4 angesäuert ist, am Rückflußkühler wiederholt extrahiert, der Alkohol wird abdestilliert, mit Wasser aufgenommen, bis zu schwach saurer Reaktion die vorhandene Säure mit NaOH abgestumpft, darauf mit basischen Bleiacetat gefällt und nun genau so wie der Harn weiter behandelt.

Jedoch ist zu bemerken, daß für Muskel und Gehirn die Reinigung mit basischem Bleiacetat nicht ausreichend ist. Man muß bei diesen Organen, — zweckmäßigerweise auch bei Magen- und Dünndarm — eine zweite Fällung mit $CuSO_4$ anschließen. Dies geschieht in der Weise, daß man nach der Entfernung des überschüssigen Bleiacetat mittels H_2S auf ein kleines Volumen ein-

engt, eine ausreichende Menge festes $CuSO_4$ einträgt, einige Minuten auf freier Flamme zum Sieden erhitzt und danach langsam erkalten läßt. Hiernach wird von dem entstandenen Niederschlage abfiltriert, das überschüssige Cu mit H_2S ausgefällt, auf dem Wasserbade eingeengt (beim Muskel darf man nur auf so viel Kubikzentimeter einengen, wie man Gramm Muskel verwendet hat) und wie beschrieben zur Phosphorwolframsäurefällung vorbereitet.

Organe von unbehandelten Tieren gaben bei Anwendung dieser Methodik niemals einen Niederschlag mit der Phosphorwolframsäure. Von zugesetztem Morphin wurden befriedigende Mengen wiedergefunden. Einige Beleganalysen mögen angeführt werden.

Zu 120 g Muskel wurden zugesetzt:
100,00 mg M. hydrochl.;
wiedergefunden: 107,20 „ „ „

Zu 100 g Muskel wurden zugesetzt:
50,00 mg M. hydrochl.;
wiedergefunden: 52,25 „ „ „

Zu 40 g Blut wurden zugesetzt:
50,00 mg M. hydrochl.;
wiedergefunden: 49,48 „ „ „

Die Verteilung im Organismus wurde in der Weise untersucht, daß Kaninchen von ca. 2000 g in die Halsvene langsam 0,4 g Morph. hydrochl. in 4 proz. Lösung injiziert wurden, während gleichzeitig die Atmung registriert wurde. Aus einer in die Carotis eingebundenen Kanüle wurde das Tier eine bestimmte Zeit nach der Injektion entblutet, die Organe entnommen und analysiert.

Die Versuche sind in der folgenden Tabelle enthalten:

Injizierte Menge M. hydrochl. in g	Entblutung nach Min.	Gewicht des Tieres in g	wiedergefunden in	mg M. hydrochl.
0,8	5	2200	44 g Blut	0
			116 g Magen u. Dünndarm	0
			40 g Leber	20—30
			161 g Muskel	11,34
0,4	15	1200	36 g Blut	0
			72 g Magen u. Dünndarm	14
			20 g Leber	16
			43 g Muskel	31

Injizierte Menge M. hydrochl. in g	Entblutung nach Min.	Gewicht des Tieres in g	wiedergefunden in	mg M hydrochl.
0,4	15	1800	54 g Blut	0
			88 g Magen u. Dünndarm	2—3
			39 g Leber	0
			85 g Muskel	10
0,4	60	1660	56 g Blut	0
			83 g Magen u. Dünndarm	Spur
			38 g Leber	0
			72 g Muskel	Spur
0,4	60	1400	45 g Blut	0
			73 g Magen u. Dünndarm	2
			33 g Leber	Spur
			31 g Muskel	2
0,4	60	2100	52 g Blut	0
			65 g Magen u. Dünndarm	Spur.
			59 g Leber	Spur
			177 g Muskel	10

Die Gehirne von 4 Versuchen werden zusammen untersucht, es ließ sich kein Morphin darin nachweisen.

An den Resultaten ist zunächst bemerkenswert, daß bereits 5 Minuten nach intravenöser Injektion von 0,8 g Morph. hydrochl. im Blute nichts mehr davon nachzuweisen ist, was bei dem positiven Ausfall der Kontrollanalyse (s. S. 280) doppelt auffällig ist. Die Befunde in den übrigen Organen sind zu wenig übereinstimmend bezw. zu wenig charakteristisch, als daß man daran weitergehende Schlüsse anknüpfen könnte. Zu berücksichtigen ist bei der Deutung der Resultate auch die Empfindlichkeit der Methode. Bei der Empfindlichkeit der Phosphorwolframsäurefällung von 1 : 10000 können in 100 g Organextrakt 10 mg Morph. unerkannt bleiben.

Die Anwendbarkeit der Methode auf andere Alkaloide.

Es liegt nahe, daß die Methode auch auf andere Alkaloide anwendbar ist. Einige Versuche in dieser Richtung lassen befriedigende Resultate erwarten.

Beispielsweise würde Oxydimorphin, wenn es im Körper entstanden wäre, durch die Anwendung der Methode nachgewiesen werden, da es mit Weinsäure ausgefällt wird, und infolgedessen

gelegentlich der Zersetzung des Phosphorwolframsäureniederschlages mit Seignettesalz sichtbar werden würde.

Auch auf Nicotin, Aconitin, Strychnin, Chinin ist die Methode mit leichten Modifikationen anwendbar, wobei jedoch noch zu beachten ist, daß ein Teil der Alkaloide mit Bleiacetat, bezw. mit basischem Bleiacetat gefällt wird. In diesen Fällen mußten andere Reinigungsverfahren verwandt werden.

Aus dem Alkoholextrakt von Fliegenpilzen läßt sich nach Verdunsten des Alkohols und Aufnehmen mit Wasser das Muskarin mit Phosphorwolframsäure ausfällen und mit Natronlauge und Seignettesalz daraus isolieren. Da Cholin mit Phosphorwolframsäure keine Fällung gibt, so ist die Trennung dieser beiden Stoffe gesichert.

Zusammenfassung.

Zusammenfassend ist also zu berichten, daß

1. eine Methode zum quantitativen Nachweis des Morphins in Harn, Kot und tierischen Organen ausgearbeitet worden ist, welche den bisher gebräuchlichen Methoden gegenüber eine erhöhte Genauigkeit besitzt und eine Ersparnis an Arbeitszeit und Reagenzien ermöglicht,

2. die Ausscheidung des Morphins in Harn und Kot bei einmaliger und dauernder Darreichung bestimmt wurde,

3. die Verteilung im Organismus untersucht wurde, wobei sich u. a. ergab, daß schon 5 Minuten nach intravenöser Injektion von 0,8 g Morph. hydrochl. bei einem Kaninchen von 2200 g im Blute kein Morphin mehr nachweisbar war;

4. die Methode auch zum quantitativen Nachweis anderer Alkaloide, sowie zur Isolierung von Alkaloide und anderen mit der angegebenen Phosphorwolframsäure fällbaren Stoffen aus tierischen und pflanzlichen Extrakten geeignet ist.

Literatur.

[1]) Cpt. rend. **129**, 110. 1899. — [2]) Chemiker-Zeit. 1890, S. 1346. — [3]) Elvove, E., Journ. of the Americ. chem. soc. **32**, 132. 1910. S. b. Korczynski, Best. der Alkaloide. — [4]) Arch. d. Pharmazie **245**, 112. 1907. — [5]) Cpt. rend. **128**, 742. — [6]) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. **32**, 2871. 1900. — [7]) Amer. journ. of pharm. 1863, S. 6. — [8]) Gadamer, Lehrbuch der chemischen Toxikologie, 1909. — [9]) Korczynski, A. v., Die Methoden der exakten quantitativen Bestimmung der Alkaloide. Berlin 1913, S. 55ff.,

daselbst auch weitere Literaturangaben. — [10]) Vgl. Gadamer, Lehrbuch der chemischen Toxikologie, 1909, S. 552. — [11]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **27**, 336. 1890. — [12]) Vgl. Gadamer, Lehrbuch der chemischen Toxikologie, 1909, S. 553. — [13]) Ebenda. — [14]) Rübsamen, W., Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **59**, 227. 1908. — [15]) Gottlieb, R. und O. Steppuhn, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **64**, 54. 191; Gottlieb, R., Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **62**, 430. 1910. — [16]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **50**, 453. 1903. — A. Babel, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **52**, 262. 1905. — [17]) Diese Zeitschr. **54**, 161. 1913. — [18]) Kenzo Tamura, Beiträge zur Kenntnis vom Schicksal des Morphins im tierischen Organismus. III. Mitt. d. med. Fakultät d. Kais. Univers. zu Tokio **23**, 219. 1920. — [18a]) Zahn, Kurt, diese Zeitschr. **68**, 444. 1915. — [19]) l. c. — [20]) l. c. — [21]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **44**, 453. 1900. — [22]) Polstorff, K., Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. **19**, 86. 1880. — [23]) Vgl. Fresenius, Quantität. Chem. Analyse, 1875 (I), S. 500. — [24]) Nach v. Kauffmann - Asser (l. c.) schieden Kaninchen im Harn zunächst ansteigende Mengen von 5 bis 39% der in 48 Stunden vorher injizierten Mengen aus, während darauf eine Abnahme der Ausscheidung bis auf 13% stattfand. — [25]) Die Phosphorwolframsäure muß gegen Licht geschützt aufbewahrt und darf höchstens einige Wochen alt werden.

Kohlensäuredruck oder Eiweißquellung als Ursache der Muskelkontraktion? II.

Von

Leonh. Wacker.

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität München).

Zugleich Richtigstellung der von Fürth in dieser Zeitschr. 113 veröffentlichten Entgegnung.

(Eingegangen am 17. Mai 1921.)

In seiner Abhandlung über die „Kolloidchemie des Muskels und ihre Beziehungen zu den Problemen der Kontraktion und der Starre"[1]) versucht Fürth, der hauptsächlich von Pauli[2]), Strietmann[3]) und M. H. Fischer befürworteten Säurequellungstheorie der Muskelkontraktion eine neue Grundlage zu verschaffen durch Annahme einer ultramikroskopischen, feineren Struktur der contractilen Substanz, die also für unsere Sinne nicht wahrnehmbar wäre und ferner histologisch nicht begründet werden kann. Nach dieser Theorie soll die bei der Arbeit oder nach dem Tode entstehende Milchsäure die Veranlassung zu Eiweißquellungen sein, die zur Muskelkontraktion bezw. Totenstarre führen.

Das Studium der anoxybiotischen Stoffwechselvorgänge im Muskel[4]) hat aber eine Reihe von Tatsachen zutage gefördert, die sich mit dieser Theorie nicht vertragen, insbesondere ergab sich, daß die zur Quellung unbedingt erforderliche freie Milchsäure

---

[1]) O. v. Fürth, Ergebn. d. Physiol. **17**, 363—571. 1918.

[2]) Wo. Pauli, Kolloidchemie der Muskelkontraktion. Steinkopff, Leipzig 1912.

[3]) W. H. Strietmann und M. H. Fischer, Zeitschr. f. Chemie u. Industrie der Kolloide **10**, 65. 1912.

[4]) W. N. Berg, Biochem. Bull. **1**, 520; **2**, 101. 1912; **3**, 177, 187. 1914. Zit. nach Fürth, a. a. O. S. 403.

gar nicht vorhanden ist[1]). Da ich mir durch mehrjährige Untersuchungen über die Vorgänge im Muskel[2]) eine besondere Anschauung über die Muskelkontraktion gebildet habe, richtete sich die Fürthsche Kritik anderer Kontraktionstheorien auch gegen meine Publikationen (a. a. O.), so daß ich mich veranlaßt sah, diese unter dem Titel „Kohlensäuredruck oder Eiweißquellung als Ursache der Muskelkontraktion"[3]) zu widerlegen. Bei dieser Gelegenheit fiel mir auf, auf welch unsicherer Grundlage die Säure-Eiweißquellungstheorie in allen ihren Einzelheiten steht und so nahm ich die Gelegenheit wahr, die ganze Lehre auf ihre Haltbarkeit zu untersuchen und kritisch zu beleuchten. Ich konnte mich dazu um so mehr berechtigt halten, als meine Untersuchungsergebnisse über die Neutralisationsvorgänge[4]) im Muskel gerade das Gegenteil von dem lehren, was Fürth jetzt den Physiologen als Arbeitshypothese empfiehlt. In seiner Entgegnung hat Fürth[5]) meinen Ausführungen z. T. eine mißverständliche Deutung gegeben, die widerlegt werden muß, um zu verhindern, daß die Muskelforschung weiterhin auf diesem Abwege beharrt. Wie erwähnt, dürfte das schwerwiegendste Bedenken gegen die Säurequellung in dem Fehlen der freien Säure zu suchen sein, weil die bei der Muskelaktion sich bildende Milchsäure sofort durch die in ausreichender Menge vorhandenen Puffersalze (Dikaliumphosphat, Kaliumbicarbonat und Kaliumalbuminat) neutralisiert wird. Die saure Reaktion des ermüdeten Muskels rührt von Monokaliumphosphat her. Wenn eine bestimmte Menge von Ermüdungsstoffen in Form von Monokaliumphosphat, Kaliumlactat und abgeschiedener Eiweißkomponente der Albuminate gebildet ist, kommt es durch Selbstregulation zu einer Hemmung der Milchsäurebildung[6]), die darin besteht, daß jene Fermente, die die Umwandlung der Kohlenhydrate in Milchsäure bzw.

[1]) A. v. Tschermak, Allgem. Physiol. **1**, 154. 1916; diese Zeitschr. **75**, 101. 1916; Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **163**, 491. 1916.

[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **168**, 147. 1917.

[3]) Diese Zeitschr. **107**, 117. 1920.

[4]) Pflügers Arch. f. d. ges Physiol. **174**, 435. 1919.

[5]) O. Fürth, Kohlensäuredruck und Eiweißquellung usw. Diese Zeitschr. **113**, 42. 1921.

[6]) Kura Kondo, diese Zeitschr. **45**, 76. 1912. Laqueur, Zeitschr. f. physiol. Chemie **93**, 60. 1914/15.

deren Vorstufe bewirken, automatisch inaktiviert werden. Dieser Punkt tritt schon ein, wenn im Muskel noch eine bestimmte Menge von Restalkalescenz[1]) nachweisbar ist. Demnach sind die Puffersubstanzen immer im Überschuß, so daß es niemals zur Bildung von freier Milchsäure kommen kann. Diesen Neutralisationsprozeß erkennt Fürth an, aber er sagt, „man muß sich darüber im klaren sein, daß sich an diesen Neutralisationsvorgängen gleichzeitig mit den Alkalikarbonaten und Alkaliphosphaten auch die Amino- und Iminogruppen der Proteine in hervorragendem Maße beteiligen. Mit einer derartigen Säurebeladung wird aber auch eine gesteigerte Hydratation derselben Hand in Hand gehen."

Dies ist vollkommen unmöglich, denn die Milchsäure kann so lange keine Verbindung mit Eiweißkörpern schwachsauren Charakters eingehen, als noch ausgesprochene alkalische Valenzen in Form von Kaliumbicarbonat und Dikaliumphosphat zugegen sind. Der Schwerpunkt liegt also in der Anwesenheit von alkalischen Salzen, die die Säure mit Beschlag belegen müßten. Wie sich die Eiweißkörper außerhalb des Muskels bei Abwesenheit von Puffersubstanzen verhalten, kommt hier nicht in Frage. Natürlich können sie mit starken Säuren Acidalbumine bilden. Es ist aber gegenstandslos, diese Möglichkeit als Gegenbeweis anzuführen, denn im Muskel ist freie Säure nicht existenzfähig; ferner sind die Acidalbumine schon irreversible denaturierte Eiweißkörper[2]), während wir es hier doch mit ionisiertem reversiblem Säureeiweiß zu tun haben. Das Wesen der Säureeiweißquellung soll doch wohl in dem reversiblen Vorgang liegen?!

Zur Bekräftigung seiner Anschauung über die Säurebindung durch Eiweiß zitiert Fürth den Urheber der Quellungstheorie Pauli (a. a. O.). Wenn man dieses Zitat nachliest (Pauli bespricht auf S. 70 die Salzsäurebindung durch Diaminoglutin), so findet man, daß es gar nicht zu dem in Rede stehenden Thema gehört. Pauli hat zwei Broschüren verfaßt, deren Titel lauten: „Kolloidchemie der Muskelkontraktion" (1912) und „Kolloidchemie der Eiweißkörper" (1920). Für unsere Auseinandersetzung wird hauptsächlich die erste maßgebend sein und dort äußert sich Pauli auf S. 17 wie folgt:

[1]) Diese Zeitschr. 75, 116. 1916.

[2]) Wo. Pauli, Kolloidchemie der Eiweißkörper. Steinkopff 1920, S. 73.

„Alle Eiweißkörper sind wohl amphotere, zur Reaktion mit Säure und Lauge befähigte Körper, aber, wie wir jetzt zuverlässig wissen, sind die Zellen und Gewebsproteine zum weitüberwiegenden Anteil viel schwächere Basen als Säuren. Deshalb erweist sich auch ihre Vereinigung mit Säuren als sehr locker und hydrolytisiert zerlegbar und aus demselben Grunde ist unser ionisches Eiweiß nur bei Gegenwart von freier Säure beständig. Auch im Osmometer hält es seinen Drucke nur gegen Säure, welche die hydrolytische Zerlegung hemmt. Sobald die Säure außen durch Wasser ersetzt wird, gibt das Säureprotein seine gebundene Säure rasch ab und der osmotische Druck sinkt auf den tiefen Ausgangswert des neutralen Eiweißes. Gleiches wird für die Fibrille gelten, wenn das Wasser außerhalb entfernt wird."

Man sieht, daß ich mit meiner Anschauung nicht so allein stehe, wie Fürth behauptet hat, denn Paulis und Abderhaldens[1]) Angaben decken sich vollkommen mit meiner Auffassung. Die Tatsache, daß die Säure-Eiweißverbindungen nur bei Gegenwart von freier Säure beständig sind, beweist, daß sie bei Gegenwart von Puffersalzen erst recht zerfallen müßten bezw. gar nicht entstehen können. Wenn übrigens, vom chemischen Standpunkte aus, überhaupt noch ein Zweifel über die Unrichtigkeit der Fürthschen Behauptung betr. Neutralisation von Milchsäure durch die Muskelproteine bei Gegenwart von Kaliumbicarbonat und Dikaliumphosphat bestehen könnte, so würde es durch die diametral entgegengesetzte Äußerung Fürths in derselben Abhandlung [387][2]) beseitigt. Er sagt wörtlich: Es wäre denkbar, daß die Gegenwart von Alkali einfach die Bindung von Milchsäure an die Muskelproteine verhindere.

Während also Fürth an einer Stelle [406] (43) eine Verbindung von Eiweiß mit Milchsäure auch bei Gegen-

[1]) E. Abderhalden, Lehrbuch der physiol. Chemie 4. Aufl., Bd. 1, S. 426. Dort heißt es: Die Globuline sind ihrer ganzen Natur nach Säuren.

[2]) Der Einfachheit halber werde ich die Seitenzahlen der zugehörigen Erörterungen in eckige Klammern z. B. [406] setzen, wenn sie sich auf Fürth, Ergebn. d. Physiol. **17**. 1918; in runde Klammern, z. B. (43) setzen, wenn sie sich auf Fürth, diese Zeitschr. **113**. 1921 und in runde und eckige Klammern, z. B. [(120)] setzen, wenn sie sich auf Wacker, diese Zeitschr. **107**. 1902 beziehen.

wart von Alkali mit allem Nachdruck als gesicherten wissenschaftlichen Besitz hinstellt, hält er es an einer anderen Stelle desselben Referats, behufs anderweitiger Beweisführung, doch für denkbar, daß das Alkali diese Verbindung verhindere [387].

Fürth hat noch eine andere Möglichkeit zur Diskussion gestellt: Nämlich eine getrennte Lokalisation der Milchsäurebildungsstätte und der Puffersubstanzen (44). Es wäre ja immerhin denkbar, daß die Milchsäure an einem anderen Ort als an der Lagerstätte der alkalischen Salze entstehen und so die Eiweißkörper zur Quellung bringen könnte. Durch das Studium der Milchsäurebildung im Muskel, besonders durch die Embdensche Schule (Kondo, Laqueur a. a. O.) sind aber die Bedingungen erkannt worden, unter denen die Milchsäure auftritt. Danach ist gerade die Anwesenheit alkalischer Salze notwendig, ein Zusatz von Bicarbonat vergrößert die Menge, während umgekehrt saure Salze und Säure das Auftreten hemmen. Also läßt sich auch durch Annahme einer getrennten Lokalisation der in Rede stehenden Muskelchemikalien die Säure-Eiweißquellungslehre nicht retten und so fällt das ganze Gebäude schon im wesentlichen Punkte zusammen.

Nach dem Vorgange Bernsteins[1]) hat Fürth für die zur Quellung bestimmten contractilen Eiweißsubstanzen eine ultramikroskopische Struktur angenommen unter der Begründung, daß Bottazzi[2]) im Buchnerpreßsaft des Muskels eine ultramikroskopisch sichtbare Ausscheidung feinster Teilchen wahrgenommen habe. Mit welchem Recht diesen eine besondere Struktur zugeschrieben wird, ist nicht ersichtlich[3]).

Wenn man nach dem Verfahren von Hans und Eduard Buchner Bakterien oder Hefe bei einigen hundert Atmosphären Druck auspreßt, so kann man auf einen verhältnismäßig einfach zusammengesetzten Preßsaft rechnen, anders liegen die Verhältnisse, wenn es sich um ein kompliziertes Gewebe handelt, wie es der Muskel ist. Dieser ist durchzogen von zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen, die ihrerseits wiederum aus einem System verschiedenartiger Zellen bestehen. Er enthält ferner Nerven, Bindegewebe, Gewebsflüssigkeit, sowie Fett, Glykogen, Zucker, Albuminate, Kreatin, Salze usw. Ein solcher Saft kann daher keine homogene Flüssigkeit darstellen, trotzdem soll er nach Fürth [380] bloß aus 2 Eiweißkörpern bestehen. Zieht man in Betracht, daß beim Auspressen sich chemische Veränderungen vollziehen, so kommt man zu der Überzeugung, daß die sog. Myosingranula aus Stoffen der verschiedenartigsten Natur (Myosin, Albumin, Nucleoproteide, Nervensubstanz, Fett, Glykogen usw.)

[1]) Bernstein, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **162**, 52. 1915.

[2]) Bottazzi und Quagliariello, Arch. internat. de physiol. **12**, 234, 289. 1912; zit. nach Fürth.

[3]) Vgl. dazu Hürthle, Berl. klin. Woohenschr. 1921, Nr. 15.

bestehen können, die nichts weniger als eine bestimmte Struktur besitzen. Mit Recht sagt daher Biedermann[1]): „Ich bin der Meinung, daß man sich bei Aufstellung einer Kontraktionstheorie vor allem an die histologisch sichtbaren Elementarbestandteile des Muskels und ihre sichtbare Struktur zu halten hat, Spekulation über unsichtbare Molekularstruktur aber nach Möglichkeit vermeiden sollte."

Diese Ansohauung Biedermanns ist um so mehr berechtigt, als begründete Aussicht besteht, daß wir mit den histologisch sichtbaren Anordnungen auskommen werden und ähnliche Strukturen beim Bindegewebe[2]) (Pia mater) Anhaltspunkte liefern, wie wir uns den Bau und die Funktion der contractilen Elemente vorzustellen haben.

Von einer Lehre über die Muskelkontraktion ist zu fordern, daß sie sich mit allen Eigenschaften des Muskels, soweit es die Hilfsmittel gestatten, in Einklang bringen läßt. Wenn aber wie bei der Quellungstheorie schon die Grundbedingung nicht einwandfrei dasteht, so ist in anderen Beziehungen, von Zufälligkeiten abgesehen, erst recht keine Übereinstimmung zu erwarten. Durch die Annahme der ultramikroskopischen Struktur hat Fürth für eine Anzahl Eigenschaften eine künstliche Harmonie geschaffen, aber nach dem Vorgesagten dürfte damit keine Förderung wissenschaftlicher Bestrebungen erreicht sein.

Mit vorstehenden Ausführungen ist die Unhaltbarkeit der Quellungstheorie in den wesentlichsten Punkten genügend bewiesen, da sie aber schon viele Anhänger besitzt, will ich im Interesse der Klarstellung dieser wichtigen Angelegenheit unter Einhaltung der früheren Reihenfolge noch die anderen Streitfragen besprechen:

I. Einwände gegen die Säure-Eiweißquellungstheorie.

ad 1. (42) [(121)]. Die Quellungstheorie vernachlässigt das Schicksal der durch die Alkalien neutralisierten Milchsäure vollkommen.

Nachdem Fürth mit Rücksicht auf die Einwände Bergs und v. Tschermaks (a. a. O.) ausdrücklich den Vorgang der Neutralisation der Milchsäure [406] bestätigt hat, wäre es notwendig gewesen, Aufschluß darüber zu geben, wie das gebildete Kaliumlactat im Organismus weiter verarbeitet wird und in welcher Beziehung zur Quellungstheorie es steht.

ad 2. (43) [(122)]. Die Unmöglichkeit der Existenz freier Milchsäure wurde schon in der Einleitung ausführlich besprochen. Mit diesem Nachweis fehlt der Quellungstheorie der Kontraktion und der Totenstarre jede Berechtigung. In den Lehrbüchern finden sich überall Angaben, daß im Muskel bei der Arbeit Milchsäure entsteht. Die Urheber der Quellungshypothese sind der mißverstandenen Auffassung zum Opfer gefallen, daß diese Säure in freiem Zustande existiert.

---

[1]) W. Biedermann, Ergebn. d. Physiol. 8. 1909.

[2]) Vgl. dazu Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 174, 427/28. 1919; Fußnote 3.

ad 3. (44) [(125)]. Gegen die Quellungstheorie wurde der berechtigte Einwand erhoben, daß sie die Erschlaffung nicht erklärt. Zur Einleitung der Erschlaffung durch Entquellung wurden eine Reihe von Möglichkeiten aufgestellt:

a) Beseitigung der Milchsäure durch Oxydation;

b) Beseitigung der Milchsäure durch Neutralisation;

c) Rückführung der Milchsäure in eine Vorstufe, Amidierung der Milchsäure, Umwandlung in cyclische Komplexsalze usw.;

d) Dehydratation des gequollenen Eiweißes durch Salze.

Sämtliche Möglichkeiten sind anfechtbar. Die oxydative Beseitigung erklärt die anoxybiotische Muskelarbeit nicht, die Neutralisation verhindert die Quellung und zu den anderen Erklärungsvorschlägen äußert sich Verzàr[1]) wie folgt:

„Immerhin scheint es doch recht schwer zu erklären, daß im Moment der Anoxybiose der Muskel zu einer neuen Art der Entfernung der Milchsäure greifen soll. Daß der normale Weg der Entfernung unter Sauerstoffverbrauch erfolgt, scheint nach den Gaswechselversuchen wohl kaum anzweifelbar."

Zu c) und d) ist noch zu bemerken, daß sie keinen Aufschluß geben über die Herkunft der Kohlensäure bei der anoxybiotischen Muskelarbeit.

ad 4. (44) [(126)]. Die Quellungstheorie erklärt die anoxybiotische Muskelarbeit nicht. Die Gründe wurden schon im vorhergehenden Abschnitt 3 aufgeführt.

ad 5. (44, 45) [(127)]. Über die Regeneration der Alkalescenz beim Erholungsvorgang gibt die Quellungstheorie keinen Aufschluß. Die neuerdings von Fürth (44) angeführte Möglichkeit der Regeneration der Alkalescenz durch Rückführung der Milchsäure in eine Vorstufe wäre annehmbar, wenn dadurch die Gesamtmenge der gebildeten Milchsäure beseitigt würde. Zum mindesten muß aber ein Teil von ihr abgebaut werden, denn sonst bestünde keine Möglichkeit zur Beschaffung der Energie für die Arbeitsleistung. Nun hat aber Fürth ausdrücklich die Neutralisation eines Teiles der Milchsäure [406] zugegeben. Dadurch werden dem Muskel natürlich alkalische Valenzen entzogen. Wenn sich dieser Vorgang wiederholt, so wird der Alkalescenzvorrat erschöpft und der Muskel wird sauer. Die Quellungstheorie gibt uns keinen Aufschluß darüber, wie sich dieser Vorgang vollzieht.

ad 6. (45) [(127)]. Meinen Einwand, daß die Ausnützung der dem Muskel zur Verfügung stehenden Energie nach der Quellungstheorie nicht ersichtlich ist, halte ich vollkommen aufrecht und verweise auf meine frühere unwiderlegte Beweisführung [(127)]. Schreber[2]) hat seine Anschauung über die Energieausnutzung von rein physikalischen Gesichtspunkten aus dargelegt, ohne die besonderen Verhältnisse des Stoffwechsels zu berücksichtigen. Auf das Widersinnige der Annahme, daß der Muskel sich bei der Erschlaffung mit der Menge poten-

[1]) Fr. Verzàr, Ergebn. d. Physiol. **15**, 99. 1916.

[2]) K. Schreber, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **159**, 288. 1914.

tieller Energie beladen müßte, die er bei der vorhergehenden Kontraktion verbraucht hat, ist er gar nicht eingegangen. Auch Reach[1]) vertritt den Standpunkt, daß eine Anzahl von Tatsachen der Muskelstoffwechselphysiologie mit der Quellungstheorie unvereinbar sind.

ad 7. (45) [(128)]. Die Quellungs- und Entquellungsvorgänge vollziehen sich viel zu langsam, um die explosionsartige Geschwindigkeit zu erklären, mit der der Muskel arbeitet. Die Annahme, daß bei ultramikroskopischen Entfernungen die Prozesse sich rascher vollziehen, ist an sich richtig, aber die ultramikroskopische Struktur ist nicht nur nicht bewiesen, sondern auch sehr unwahrscheinlich. Ferner kommen bei der Gröberschen[2]) Beweisführung 3 Vorgänge in Betracht, die eine gewisse Zeit beanspruchen, nämlich Quellung, Beseitigung der Milchsäure und Entquellung. Quellungsvorgänge sind aber sehr langsam reversibel, d. h. die Entquellung ist sehr zeitraubend.

Schreber (a. a. O. S. 289) schreibt: Die Vertreter der Quellungshypothese hätten zunächst eine Maschine zu ersinnen, die einen Wirkungsgrad von 60% ermöglicht und dann nachzuweisen, daß die Bedingungen, unter denen die Maschine arbeitet, im Körper möglich sind.

Man kann sich vorstellen, wie eine solche nach Art einer Lokomobile konstruierte Maschine arbeiten würde. Zur Quellung wäre schon etwa 1 Tag erforderlich und zur Entquellung etwa 2 Tage, d. h. das Rad der Lokomobile würde in 3 Tagen eine Umdrehung machen.

II. Entgegnung auf die Einwände gegen die osmotische und Kohlensäure-Theorie.

A. Einwände gegen die osmotische Theorie.

ad a). (45) [(129)]. Der Einwand betr. Struktur der Fibrillen ist in meinem Sinne erledigt.

ad b). (46) [(136)]. Nach Fürth soll die vorhandene Menge Sarkoplasma allzu gering sein, um eine ausgiebige Flüssigkeitsaufnahme aus dem Sarkoplasma in die Muskelelemente wahrscheinlich erscheinen zu lassen. Diese Behauptung ist gegenstandslos, weil bekannt ist, daß viele Muskeln, insbesondere die rascharbeitenden (roten), sogar sehr viel Sarkoplasma enthalten, dessen Menge in Zusammenhang mit der physiologischen Funktion steht. Tatsächlich ist immer Sarkoplasma vorhanden und daher auch immer die Möglichkeit der Flüssigkeitsaufnahme gegeben. Die sich nach dem Bedürfnis richtenden Mengenverhältnisse können am Prinzip nichts ändern.

ad c). (46) [(131)]. Ein weiterer Einwand gegen die osmotische Theorie lautet: Bei der Beobachtung der Kontraktion am lebenden Muskel vermochte Hürthle weder eine Volumzunahme der Fibrillen im ganzen noch ihrer doppeltbrechenden Abschnitte festzustellen. Hierüber äußert sich Hürthle[3]) in seiner Entgegnung

[1]) F. Reach, Fortschr. d. Naturwiss. **10**, 125. 1914.

[2]) J. Gröber, Münch. med. Wochenschr. **59**, 2433. 1912.

[3]) K. Hürthle, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **158**, 102. 1914.

auf die Bedenken Meigs[1]) wie folgt: „Die Quellungshypothese in der Formulierung von Mc Dougall, wonach die Fibrillen im ganzen die quellenden Elemente darstellen, läßt sich an den lebenden Fasern insofern weder bestätigen noch widerlegen, als die Photogramme über das Verhalten der einfachbrechenden Abschnitte der Fibrillen weder im polarisierten noch im gewöhnlichen Licht Aufschluß geben."

Durch diese Erklärung Hürthles wird der Fürthsche Einwand hinfällig, im übrigen verweise ich nochmals auf meine theoretischen Erwägungen über die Arbeitsleistung bei konstantem Volumen.

Allbekannt ist die Tatsache, daß Quellungserscheinungen mit Volumvermehrung einhergehen. Der an sich unbegründete Einwand würde daher auch gegen die Quellungstheorie sprechen.

ad d). (46) [(132)]. Die osmotische Theorie soll auf die glatte Muskulatur nicht anwendbar sein. Die Einzelheiten über den Bau der glatten Muskulatur sind wenig bekannt. Solange diese Schwierigkeiten nicht überwunden sind, können Schlüsse über die Berechtigung oder Nichtberechtigung einer Kontraktionslehre nicht gezogen werden. Der Einwand ist also zu einer Beweisführung ungeeignet.

ad e). (46). Die osmotische Theorie soll keinen Anhaltspunkt für die Erklärung der elektrischen Erscheinungen bei der Muskelkontraktion liefern. Wenn auch die osmotische Theorie in der früheren Form die elektrischen Erscheinungen nicht erklärt, so genügt sie den Anforderungen in Verbindung mit der Kohlensäuretheorie. Ich habe schon ausdrücklich [(133)] auf die Habersche[2]) Auffassung über die Entstehung der elektrischen Phasengrenzkräfte hingewiesen. Sie steht vollkommen auf dem Boden der tatsächlichen Stoffwechselvorgänge, insbesondere des Kohlensäurestoffwechsels und ist im Einklang mit den Vorstellungen von Hermann und Tschagoretz[3]). Haber und Tschagoretz sind auf verschiedenen Wegen zu derselben Anschauung gelangt. Gegen die Paulische Deutung der Entstehung der Muskelströme gilt derselbe Einwand wie gegen die Quellungstheorie (Fehlen der freien Milchsäure). Auch Verzàr (a. a. O.) wendet sich aus dreierlei Gründen gegen die Paulische Auffassung.

ad f). (46) [(133)]. Die osmotische Theorie trägt dem optischen Verhalten des Muskels in keiner Weise Rechnung. Wenn man auf diesen Einwand näher eingeht, so stößt man auf die widersprechenden Anschauungen zweier ausgezeichneter Beobachter [387]. Die Klarstellung der Verhältnisse bietet also den Histologen noch Schwierigkeiten. Es ist daher zwecklos, die Veränderungen der Doppeltbrechung bei der Kontraktion beispielsweise durch Stoffwechselvorgänge oder Fällungserschei-

---

[1]) E. B. Meigs, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **158**, 92. 1914.

[2]) Fr. Haber und Z. Klemensiewicz, Zeitschr. f. physikal. Chem. **67**, 385. 1909.

[3]) Lit. nach Fr. Verzàr, Ergebn. d. Physiol. **15**, 93 u. 98. 1916. Fußnote 2; W. Biedermann, Ergebn. d. Physiol. **2**, 174. 1903.

nungen erklären zu wollen. Zu einer Beweisführung pro oder contra ist das optische Verhalten einstweilen nicht geeignet, weil man nicht wissen kann, wie die endgültige Entscheidung ausfallen wird.

B. Einwände gegen die Kohlensäuretheorie.

ad a). (47). Absolute Muskelkraft. Um Wiederholungen zu vermeiden, verweise ich zunächst auf meine früheren Ausführungen [(134)], die Fürth im wesentlichen als berechtigt anerkennen mußte. Bei Zugrundelegung der Hälfte des Fibrillenvolumens als Druckraum berechnet sich, daß von 1 kg (= ca. 1 Liter) Muskel nur der 6. bis 10. Teil, d. h. 170 bis 100 ccm (im Mittel 135 ccm) als solcher in Frage kommt. Dem von Fürth vorgeschlagenen Milchsäurebildungsmaximum von 0,5%, d. h. 2,5 g pro kg Muskel entsprechen 2,444 g CO_2. Bei einem spezifischen Gewicht der Kohlensäure von 1,965 nehmen diese 2,444 g einen Raum von 1,244 Liter bei 0° C ein. Es ist also der Druck zu berechnen, den 1,244 Liter CO_2 ausüben, wenn sie bei Muskeltemperatur (ca. 38° C) auf 135 ccm zusammengepreßt sind. Nach dem Boyleschen Gesetz ergibt sich dann bei 0° ein Druck von 9,2 Atmosphären, der sich nach Gay-Lussac bei 38° auf 10,49 Atm. erhöht. Es besteht demnach die Möglichkeit schon, ohne die Hilfe des osmotischen Druckes und ohne eine Temperaturerhöhung im Muskel einen Überdruck von 10 Atm. zu errechnen. Da osmotischer und Kohlensäuredruck gleichzeitig wirken, ist es nicht mehr nötig mit Zuntz[1]) außergewöhnlich hohe Temperaturen anzunehmen. Die Zweifel Fürths an der Möglichkeit der Entstehung hohen Drucks wegen der Durchlässigkeit der Wände teile ich nicht. Ich stelle sie mir auch als durchlässig für CO_2 vor, aber nur in beschränktem Maße, so daß sie nur eine langsame Kohlensäureabfuhr gestatten. Durch die explosionsartige Kohlensäureentwicklung (man erinnere sich nur an das Brausepulver) entsteht momentan ein hoher Druck, der aber rasch zurückgehen muß, weil sonst die Erschlaffung unmöglich wäre. Dies wird ermöglicht durch die Anwesenheit von Dikaliumphosphat und Kaliumalbuminat. Bei der Einwirkung von CO_2 auf die erwähnten Substanzen wird Bicarbonat regeneriert, so daß der Muskel sofort zur nächsten Druckbildung bereit ist. Es wird sich also für kurze Zeit ein Druck von 10 Atm. erreichen lassen, aber um ihn zu halten, müssen immer neue Reize (wie beim Tetanus) folgen, um immer von neuem CO_2 zu produzieren. Auf diese Verhältnisse werde ich bei Besprechung der Energieausnutzung noch zurückkommen.

ad b). (48) [(137)]. In Rohrzuckerlösungen verlieren die Muskeln nach Overton[2]) ihre Natriumsalze und damit die Erregbarkeit [435]. Durch Einlegen in Natriumsalze irgendwelcher Natur gewinnen sie diese zurück. Von der irrtümlichen Annahme ausgehend, daß im Muskel Natriumbicarbonat enthalten sei, das durch die Rohrzuckerlösung ausgelaugt wird, glaubt Fürth einen Einwand gegen die

---

[1]) N. Zuntz, Oppenheimers Handbuch der Biochemie Bd. IV (1), S. 863.

[2]) Overton, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **92**. 381. 1902.

Kohlensäuretheorie herleiten zu können. Die Unerregbarkeit, meint Fürth, ließe sich durch Entfernung des Natriumbicarbonats erklären, aber die Wiederherstellung der Erregbarkeit dürfte nur wieder durch Bicarbonat, nicht aber durch andere Natriumsalze möglich sein. In dieser Form wäre der Einwand berechtigt, aber tatsächlich liegen andere Verhältnisse vor: Es ist nachgewiesen, daß der Muskel in Rohrzuckerlösungen seine Kontraktionsfähigkeit nicht vollkommen verliert[1]) und nicht Natriumbicarbonat, sondern das entsprechende Kaliumsalz [(137)] befindet sich im Muskel, der das Vermögen hat, Kaliumsalze festzuhalten. So fanden Urano[2]) und Meigs[3]), daß durch eine $6^1/_2$proz. Rohrzuckerlösung aus dem Muskel in erster Linie Natriumsalze und fast keine Kaliumsalze extrahiert werden. Für die Behauptung, daß Kaliumbicarbonat extrahiert wird, ist Fürth den Beweis schuldig geblieben.

ad o). (48) [(138)]. Nach meinem auf histologischen Unterlagen konstruierten Muskelmodell besteht die Möglichkeit, daß sich die Muskelelemente über die Kugelgestalt hinaus zusammenziehen können[4]), und damit ist ohne weiteres die Möglichkeit jedes Verkürzungsgrades gegeben, wie man sie am Muskel beobachtet. (Im mikroskopischen Bild sind die dabei sich vollziehenden Formänderungen deshalb nicht verfolgbar, weil nach Hürthle [a. a. O.] die Photogramme über das Verhalten der einfachbrechenden Abschnitte keinen Aufschluß geben.) Der dem Fürthschen Einwand zugrunde liegende Gedanke ist nicht neu, sondern gerade diese Erwägung war die Veranlassung zu einem genaueren Studium der Verhältnisse[5]) und zur Konstruktion der Muskelmodelle. Dabei hat sich gezeigt, daß ähnliche Strukturen beim Bindegewebe vorkommen[6]) und ferner, daß ein zweites Verkürzungsmoment besteht[7]), das ich als Bündelverkürzung bezeichnet habe [(139)].

Ich werde an anderer Stelle den Beweis führen, daß die beobachteten Verkürzungsgrade schon bei Annahme der Kugelgestalt (der Muskelelemente) erreicht werden können.

III. Über das Vorkommen und die Bedeutung der Alkalialbuminate im Muskel (49) [447] [(140)].

Bei der Extraktion möglichst frischer Muskeln werden im Kochextrakt erhebliche Mengen von Kaliumalbuminat gefunden, die gradatim abnehmen, je saurer der Muskel wird, weil die sich bildende Milchsäure aus dem Kaliumalbuminat die wasserunlösliche Komponente abscheidet und dadurch die Totenstarre einleitet. Bei Leichen, die keine oder nur eine geringe Totenstarre aufweisen, findet sich das Kaliumalbuminat im Kochextrakt in großer

[1]) P. Jensen, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **160**, 333. 1915.
[2]) F. Urano, Zeitschr. f. Biol. **50**, 212. 1907; **51**, 483. 1908.
[3]) J. B. Meigs, Journ. of exp. Zoology **13**, 498. 1912.
[4]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **169**, 492. 1917.
[5]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **168**, 174. 1916.
[6]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **174**, 428. 1919; Anmerkung.
[7]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **169**, 502. 1917.

Menge, bei Leichen mit starker Totenstarre sind im Extrakt nur noch Spuren desselben[1]). Bei starker Totenstarre ist also die Eiweißkomponente im Muskel abgeschieden worden. Beim Herzmuskel menschlicher Leichen findet man häufig, daß der linke Ventrikel eine kräftigere Totenstarre besitzt als der rechte, dementsprechend zeigt der rechte mehr Albuminate im Kochextrakt als der linke[2]). Die Verhältnisse sind so charakteristisch, daß an der Präexistenz der Kaliumalbuminate kein Zweifel bestehen kann, auch ist nicht einzusehen, wie im Kochextrakt desselben Herzens oder desselben Skelettmuskels im einen Fall ein Kunstprodukt entstehen soll, im anderen nicht. Für die Behauptung, daß ein Kunstprodukt vorliegt, ist Fürth in diesem Falle auch wieder den Beweis schuldig geblieben. Auch aus der Literatur ergibt sich die Unrichtigkeit dieser Behauptung. Albuminate sind allenthalben unter den Muskeleiweißkörpern gefunden worden [(141)]. Je nach der Arbeitsweise und dem Stadium der postmortalen Säurebildung waren die nachgewiesenen Mengen größer oder geringer. Besonders Kühne[3]) hat in grundlegenden Untersuchungen nachgewiesen, daß bei sorgfältiger Kühlung viel Kaliumalbuminate im Preßsafte vorhanden sind. Fürth allerdings hat diese Kühlung für überflüssig gehalten. Die Kaliumalbuminate sollen dem Myosinogen Halliburtons entsprechen. Für unsere Beweisführung ist es gleichgültig, mit welchem Namen diese Eiweißkörper unbekannter Konstitution belegt werden. Wesentlich ist nur, daß die Eigenschaften übereinstimmen. Sie müssen bei Körpertemperatur mit Kaliumbicarbonat unter CO_2-Entbindung in Lösung gehen bzw. je nach Temperatur, Mengen und Druckverhältnissen zu der im folgenden Schema ausgedrückten reversiblen Reaktion befähigt sein:

$$\text{Alb}^{4}) \text{ H} + \text{KHCO}_3 \rightleftarrows \text{Alb K} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}.$$

Die Existenz solcher Eiweißkörper im Muskel ist außer Frage, denn außer Kühne u. a. schreibt Tigerstedt in seinem Lehrbuch „Die alkalische Reaktion des Muskels ist durch Alkalibicarbonat, Diphosphat und Alkaliverbindungen der Eiweißkörper bedingt." Vgl. dazu die früheren Ausführungen [(140—144)].

Aus dem Vorhandensein von Kaliumalbuminaten im Kochextrakte frischer oder nicht totenstarrer Muskeln und dem Fehlen derselben im Extrakte der totenstarren Muskeln[5]) ergibt sich, daß die Totenstarre neben osmotischem und Kohlensäuredruck auf Eiweißfällung und nicht auf Eiweißquellung beruht.

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **174**, 438. 1919; Berl. klin. Wochenschr. 1919, Nr. 42, S. 990.

[2]) Unveröffentlichte Versuche des cand. med. Oberzimmer.

[3]) Kühne, Untersuchungen über das Protoplasma. Leipzig 1864.

[4]) Alb = Eiweißkomponente.

[5]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **174**, 438. 1919; Berl. klin. Wochenschr. 1919, Nr. 42, 990.

Anhang.

Der Gaswechsel bei der anoxybiotischen Arbeit als Stütze der Kohlensäuretheorie.

Der ausgeschnittene Muskel produziert auch in sauerstofffreier Atmosphäre Kohlensäure[1]). In einer Stickstoffatmosphäre fand Fletcher[2]) im ersten Stadium des Überlebens die Kohlensäureproduktion gegenüber der Norm vermindert (vielleicht sogar ganz unterbrochen), nach 4—5 Stunden war aber die CO_2-Abgabe ebenso groß wie die des Kontrollmuskels in Luft. Bei der anoxybiotischen Arbeit beobachtete Hermann[3]) eine Steigerung der CO_2-Produktion. Diese vermehrte CO_2-Produktion fehlt nach Fletcher bei kurzdauernden Versuchen, sie stellt sich aber ein bei wiederholter Reizung und ist dann vom Eintritt der Totenstarre begleitet. Diese eigenartigen Erscheinungen lassen sich durch die Kohlensäuretheorie und die Rolle der Puffersubstanzen im Muskel erklären. Die in Frage kommenden chemischen Prozesse sind die folgenden:

I. $CH_3CHOHCOOH - KHCO_3 = CH_3CHOHCOOK + CO_2 + H_2O$,

II. $K_2HPO_4 - CO_2 - H_2O \rightleftarrows KH_2PO_4 - KHCO_3$.

Entsteht infolge eines Reizes Milchsäure, so wird diese sofort nach Formelgleichung I unter Kohlensäureproduktion neutralisiert. Der entstandene Kohlensäuredruck im Verein mit dem osmotischen Druck ist die Kraftquelle. Der Kohlensäuredruck wird rasch durch das in reichlicher Menge vorhandene Dikaliumphosphat beseitigt und dadurch wird eine rasche Rückkehr in den Erschlaffungszustand möglich. Dieser Vorgang erfolgt nach Gleichung II, wobei $KHCO_3$ regeneriert wird. So erklärt sich, daß zunächst bei Abwesenheit von Sauerstoff eine Verminderung der Kohlensäureproduktion eintritt (obwohl eine gewisse Menge CO_2 nachweisbar sein wird, weil die Wände der Muskelelemente bis zu einem gewissen Grad für CO_2 durchlässig sein werden). Wiederholen sich die Reize, so wird allmählich der Vorrat an Dikaliumphosphat erschöpft, es geht vollkommen in Monophosphat über und hat damit die Fähigkeit zur Kohlensäureaufnahme ver-

[1]) Siehe z. B. bei O. Frank, Ergebn. d. Physiol. **3**, 389. 1904; Fr. Verzár, Ergebn. d. Physiol. **15**, 36 u. 64. 1916.

[2]) W. M. Fletcher, Journ. of physiol. **23**, 410. 1898/99.

[3]) L. Hermann, Untersuchungen über den Stoffwechsel des Muskels. 1867.

loren. Wird dann von neuem Milchsäure gebildet, so kann sich nur noch Prozeß I vollziehen, d. h. es muß zu einer vermehrten CO_2-Abgabe kommen. Dann ist aber auch der Zeitpunkt gekommen, wo das Monokaliumphosphat bzw. die entstehende Milchsäure die Gesamtmenge der vorhandenen Kaliumalbuminate unter Abscheidung der Eiweißkomponente zerlegen. Die halbfeste Ausscheidung verhindert die Rückkehr des Muskels in die Ruhelage, d. h. die Totenstarre tritt ein.

Der Verkürzungsrückstand nach der Kohlensäuretheorie.

In ähnlicher Weise läßt sich auch der Verkürzungsrückstand nach hochgradiger Ermüdung erklären. Durch wiederholte Reize und Kohlensäureproduktion wird das Dikaliumphosphat großenteils aufgebraucht (ganz erschöpft wird es deshalb nicht, weil gleichzeitig bei Anwesenheit von Sauerstoff durch Oxydation aus dem Kaliumlactat Kaliumbicarbonat regeneriert wird). Immerhin kann durch das Überhandnehmen des Monokaliumphosphats der Kohlensäuredruck nur langsam und unvollkommen beseitigt werden. Vielleicht ist auch schon ein Teil des Alkalialbuminats zerlegt worden. Dadurch wird der Muskel behindert, vollkommen in die Ruhelage zurückzukehren.

Die tonische Muskelkontraktion nach der Kohlensäuretheorie.

Wird die Säurebildung durch tetanische Reize (und die damit verbundene Hemmung der Sauerstoffzufuhr) intra vitam so weit getrieben, daß das Dikaliumphosphat aufgebraucht wird, so wird schließlich das gleichfalls als Puffer wirkende Kaliumalbuminat nach folgendem Schema zerlegt:

$$CH_3\,CHOH\,COOK + KAlb = CH_3\,CHOH\,COOK + AlbH.$$

Auch in diesem Falle scheidet sich das Albuminat-Eiweiß als dicker, steifer weißer Brei aus, der den Muskel verhindert, in die Ruhelage zurückzukehren. [Dadurch ließe sich die Beobachtung Biedermanns[1]) erklären, daß die glatten Muskeln gewisser Würmer und Mollusken im Ruhezustand glashell und durchsichtig sind, während sie bei der Kontraktion weiß und trübe verbleiben, bis die Zusammenziehung aufgehört hat.]

Wird die Blut- und Sauerstoffversorgung aus irgendeinem Grunde ausgeschaltet, so beharrt der Muskel in diesem Spannungs-

[1]) W. Biedermann, Ergebn. d. Physiol. 8, 151. 1909.

zustand. Unter solchen Umständen zeigt der Muskel keine Stoffwechsel-, Wärme- und Ermüdungserscheinungen und auch die Aktionsströme müssen fehlen[1]), er wirkt also lediglich als Sperrvorrichtung. Dieser Zustand ist, zum Unterschiede von der Totenstarre, reversibel. Nach Wiederherstellung der Blutzufuhr wird das ausgeschiedene Eiweiß wieder in Lösung gebracht, so daß der Muskel in die Ruhelage zurückkehren kann. Die Lösung des Eiweißes geschieht unter Kohlensäureentbindung durch das Alkalibicarbonat, das erst wieder durch Oxydation des Kaliumlactats entsteht oder aus dem Blute stammen kann.

Auf diese Weise lassen sich auch pathologische Erscheinungen, soweit sie hypertonischer Natur sind, wie z. B. Muskelhärten, erklären[2]).

Zur Frage der Energieausnützung nach der osmotischen und Kohlensäuretheorie.

Um einer maximalen Muskelkraft von 7 kg pro qcm auf Grund der osmotischen Drucksteigerung im Innern der Muskelelemente gerecht zu werden, sah sich bekanntlich Zuntz (a. a. O.) genötigt, eine erheblich erhöhte Temperatur, verursacht durch die Oxydationsprozesse, anzunehmen. Die errechneten hohen Temperaturgrade scheinen aber mit der lebenden Substanz unverträglich und bilden ein Hauptargument gegen die osmotische Theorie[3]). Diese Verhältnisse gestalten sich wesentlich anders, wenn man den Kohlensäuredruck berücksichtigt, der gleichzeitig mit dem osmotischen Druck zur Geltung kommt. Es ist dann nicht nötig, außergewöhnliche Temperaturerhöhungen in Rechnung zu stellen, wenn auch mit einer mäßigen Steigerung gerechnet werden kann, was ja schon aus der erhöhten Körpertemperatur bei der Muskelarbeit hervorgeht.

Die jetzt wohl allgemein akzeptierte Anschauung, daß anoxybiotische Vorgänge die Ursache der Muskelkontraktion bilden, findet eine weitere Stütze in einigen neuerdings experimentell sichergestellten Stoffwechselvorgängen im Muskel. Nach den Untersuchungen von Meyerhof[4]) wird während des Erholungs-

[1]) O. Frank, Ergebn. d. Physiol. **3**, 495. 1904.

[2]) E. Grafe, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 49. Fr. Lange und G. Eversbusch, Münch. med. Wochenschr. **68**, Nr. 14, S. 418. 1921.

[3]) K. Schreber, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **159**, 288. 1914.

[4]) O. Meyerhof, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **182**, 267. 1920; **185**, 15. 1920.

prozesses $^2/_3$—$^3/_4$ der gebildeten Milchsäure in das hochmolekulare Glykogen zurückverwandelt. Dadurch findet eine Verminderung des osmotischen Druckes statt, die die Rückkehr in die Ruhelage erleichtert und andererseits steht beim Abbau des regenerierten Glykogens zur Milchsäure dem Muskel eine weitere Quelle osmotischer Energie zur Verfügung[1]), die letzten Endes eine Ausnützung der Verbrennungswärme der Kohlenhydrate bedeutet. Der Rest der Milchsäure, d. i. $^1/_4$ bis $^1/_3$ der Gesamtmenge, wird nach erfolgter Neutralisation als Alkalilactat oxydiert und liefert die die Muskelarbeit begleitende Wärme, wovon ein geringerer Teil zu der erwähnten Regeneration des Glykogens verbraucht wird. Ein Teil der im Lactat gespeicherten Energie kann noch in anderer Weise zur Arbeitsleistung herangezogen werden.

Stellt man sich vor, daß das milchsaure Kali zu brenztraubensaurem Kali oxydiert wird und dieses der Carboxylasespaltung

Schema des Glykogenabbaues im Muskel unter dem Einfluß von hydrolytischen und oxydierenden Fermenten insbesondere der Carboxylase.

Anoxybiotische, der Arbeitsleistung dienende Prozesse		Oxybiotische, der Erholung dienende Vorgänge
Osmotischer Druck (hydrolytischer Abbau)	Kohlensäuredruck (Neutralisation)	Wärmeproduktion (Oxydation)
$(C_6H_{10}O_5)_2H_2O + 8H_2O = 18\,C_3H_6O_3$ Glykogen — Milchsäure Zuwachs: 18 Moleküle	$18\,C_3H_6O_3 + 18\,KHCO_3 = 18\,C_3H_5O_3K$ Kaliumlactat $+ 18\,CO_2 + 18\,H_2O$	$18\,CH_3CHOH\,COOK + 9\,O_2$ Kaliumlactat $= 18\,CH_3COCOOK + 18\,H_2O$ brenztraubensaur. Kal.
$18\,CH_3COCOOK + 18H_2O$ $= 18\,KHCO_3 + 18\,CH_3CHO$ (Acetaldehyd) Zuwachs: 18 Moleküle	$18\,CH_3COOH + 18KHCO_3$ $= 18\,CH_3COOK + 18\,CO_2 + 18\,H_2O$	$18\,CH_3CHO + 9\,O_2 = 18CH_3COOH$[2]) Essigsäure
Prozeß des Abbaues zur Einkohlenstoffreihe Zuwachs: 18 Moleküle	$18\,CHOOH + 18\,KHCO_3 = 18\,CHOOK$ Ameisensäure $+ 18\,CO_2 + 18\,H_2O$	Oxydationsvorgang zur Ameisensäure[3]) $18\,CHOOK + 9\,O_2 = 18\,KHCO_3$ ameisensaur. Kal.

[1]) Als Zwischenprodukt entsteht die hochmolekulare Hexosephosphorsäure. Vergl. Embden und Laqueur, Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 1921; 1.

[2]) Essigsäure wurde im Muskel nachgewiesen, vgl. Brieger, Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. **10**, 1028.

[3]) Nach Stepp und Lange, sowie Stepp und Zumbusch entsteht beim Kohlenhydratabbau Ameisensäure. Diese Zeitschr. **107**, 60. 1920; Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 99. 1920.

nach Neuberg[1]) unterliegt, so wird die weitere Möglichkeit zur Gewinnung anoxybiotischer Energie klar ersichtlich.

Die Vorgänge sind, ohne Berücksichtigung allenfallsiger Zwischenprodukte beim Abbau von Glykogen zur Milchsäure, in der vorstehenden schematischen Übersicht wiedergegeben:

Wie aus diesem Schema ersichtlich, zerfällt der Glykogenabbau[2]) in 3 hydrolytische Prozesse, charakterisiert durch den Zuwachs von je 18 Molekülen, die die Vermehrung des osmotischen Druckes bedingen. Ferner vollziehen sich 3 Neutralisationsvorgänge, die zur Steigerung des Kohlensäuredruckes führen, und schließlich kommen noch 4 Oxydationsvorgänge in Frage. Die Carboxylasespaltung und der letzte Oxydationsprozeß liefern Kaliumbicarbonat. Die Entstehung des Kaliumbicarbonats beim letzten oxybiotischen Vorgang deckt sich mit der Tatsache der Regeneration der Alkalescenz bei der Erholung. Die anoxybiotisch frei werdenden Energien sind direkt zur Kraftübertragung geeignet.

Die bei der Kontraktion frei werdende (initiale) Wärme wurde von Hill[3]) u. a. gemessen. Sie beträgt pro 1 g gebildete Milchsäure 449 Cal. Rechnet man die Verbrennungswärme des Glykogens zu 4190 Cal., jene der Milchsäure zu 3661 Cal., so entsprechen den aus 1 g Glykogen entstehenden 1,097 g Milchsäure 4016,1 Cal., d. h. 1 g Glykogen enthält 174,5 Cal. mehr als 1,097 g Milchsäure, folglich werden auf 1 g Milchsäure 159 Cal. frei. Dazu kommt noch die Neutralisationswärme der Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure im Betrage von dreimal ca. 27 Cal. $\doteq$ ca. 81 Cal., in Sa. $159 + 81 = 240$ Cal. Es fehlen demnach gegenüber der von Hill gemessenen Wärme noch $449 - 240 = 209$ Cal. Über die Herkunft dieses Überschusses herrscht noch Unklarheit. Meyerhof (a. a. O.) spricht die Vermutung aus, daß er nicht chemischen Ursprungs sei, sondern auf die die Ermüdung begleitenden physikalischen Vorgänge, wie Quellung, Adsorption, kolloide Zustandsänderung u. dgl. zurückgeführt werden müßte, läßt aber doch die Möglichkeit rein chemischer Prozesse als Wärmequelle zu. Die zuletzt ausgesprochene Ansicht Meyerhofs ist nicht unwahrscheinlich; denn auf der Suche nach der Herkunft des Überschusses werden, außer den schon erwähnten, auch noch jene anoxybiotischen Zwischenprozesse zu berücksichtigen sein, welche der Milchsäurebildung aus Laktacidogen und der Regulation der Kohlensäureabfuhr dienen und die jedenfalls auch mit einer gewissen Wärmetönung verlaufen. Es ist hier an die Einwirkung von Kohlensäure auf Dikaliumphosphat und Kaliumalbuminat zu denken.

[1]) C. Neuberg, Handb. d. Bioch. Ergänz.-Bd., S. 569. 1913.

[2]) Das Glykogenmolekül wurde aus 9-Hexosemolekülen bestehend angenommen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 149. 1911.

[3]) Hill, Ergebn. d. Physiol. **15**, 340. 1916; Meyerhof, a. a. O. S. 267: Parnas Centralbl. f. Physiol. **36**, 1. 1915.

Zusammenfassung.

I. Quellungstheorie.

Die Quellungstheorie ist als Arbeitshypothese für die Muskelforschung nicht zu empfehlen, weil die erste Voraussetzung für die Quellung des Eiweißes, das Vorhandensein der hierzu erforderlichen freien Milchsäure, widerlegt ist.

Nachträgliche Versuche Fürths, diese Theorie durch die Annahme zu stärken, daß an der Neutralisation der Milchsäure auch die Muskelproteine sich beteiligen, stehen nicht im Einklang mit den Eigenschaften der Säureeiweißkörper und führen zu Widersprüchen.

Nachdem die Quellungstheorie schon in den Unterlagen auf ein Mißverständnis aufgebaut ist, sind folgerichtig auch andere wichtige Eigenschaften der Muskel, wie die Erschlaffung, die anoxybiotische Muskelarbeit, die Regeneration der Alkalescenz bei der Erholung usw. mit Hilfe dieser Hypothese nicht zu erklären.

II. Osmotische Theorie.

Die Fürthschen Einwände gegen die osmotische Theorie entbehren teilweise schon in den Voraussetzungen der tatsächlichen Unterlage und im anderen Teil sind sie für eine klare Beweisführung ungeeignet.

Der Behauptung, die Muskeln besäßen eine geringe Menge Sarkoplasma, widerspricht die Feststellung, daß in vielen Fällen gerade das Gegenteil zutrifft. Zur Volumkonstanz der Fibrillen nach Hürthle ist zu entgegnen, daß dieser eine Volumkonstanz der Fibrillen im ganzen weder bestätigt noch widerlegt. Das Verhalten der glatten Muskeln ist zu einer Beweisführung ebenso ungeeignet wie die optischen Eigenschaften, da in einem Fall die histologischen Unterlagen zu unvollkommen sind und im anderen eine Divergenz der Anschauung besteht. Die elektrischen Eigenschaften scheinen zwar durch die osmotische Theorie an sich einer Erklärung nicht direkt zugänglich, lassen sich aber mit Hilfe der Kohlensäuretheorie verstehen.

Hieraus ersieht man, daß sämtlichen Einwänden gegen die osmotische Theorie die Beweiskraft mangelt.

III. Kohlensäuretheorie.

1. Gegen die Kohlensäuretheorie wendet Fürth ein, daß der Druck zu einer maximalen Kraftleistung nicht hoch genug sei. Demgegenüber wurde der Beweis geführt, daß in den Muskelele-

menten ein Kohlensäuredruck von über 10 Atmosphären entstehen kann, wobei der osmotische Druck und die Temperaturerhöhung noch nicht berücksichtigt sind.

2. Verkürzungsgrad. Bei Herstellung der Muskelmodelle wurde von vornherein dem etwaigen Einwand betr. Kugelgestalt der Muskelelemente Rechnung getragen. Dies hat zur Aufstellung des Prinzips der Fibrillen- und Bündel-Verkürzung geführt. Es läßt sich der Beweis führen, daß der Einwand grundlos ist.

3. Rohrzuckermuskeln. Hier hat Fürth übersehen, daß Kaliumsalze durch Rohrzuckerlösungen nicht extrahierbar sind.

Es ist demnach Fürth nicht gelungen, überzeugende Argumente gegen die Richtigkeit der Kohlensäuretheorie zu bringen.

IV. Über die Kaliumalbuminate des Muskels.

Der Nachweis von Alkalialbuminaten im frischen Muskel und deren Fehlen im totenstarren deutet darauf hin, daß sich bei der postmortalen Säurebildung ein Eiweißkörper abscheidet, der die Totenstarre einleitet. Die Abwesenheit freier Milchsäure spricht gegen die Quellungstheorie der Totenstarre.

Anhang:

I. Der Verlauf der Kohlensäureproduktion bei der anoxybiotischen Arbeit bildet eine Stütze der Kohlensäuretheorie.

II. Der Verkürzungsrückstand des Muskels nach der Ermüdung läßt sich nach der Kohlensäuretheorie leicht erklären.

III. Die tonische Muskelkontraktion ist nach der Kohlensäuretheorie als eine durch Eiweißfällung hervorgerufene reversible Sperrvorrichtung aufzufassen, die ohne Stoffwechsel-, Wärme- und Ermüdungs-Erscheinungen funktioniert.

IV. Die chemischen Vorgänge beim Glykogenabbau zerfallen in 3 hydrolytische, die den osmotischen Druck erhöhen, ferner in 3 Neutralisationsprozesse, bei denen Kohlensäuredruck entsteht, und in 4 Oxydationsprozesse, die der Erholung dienen und schließlich zur Regeneration der Alkalescenz führen.

Die beiden ersten, anoxybiotischen Prozesse lassen sich direkt in Arbeit umsetzen.

Durch Regeneration von Glykogen aus Milchsäure beim Erholungsvorgang wird osmotische Energie gewonnen, die in letzter Linie eine Ausnutzung der Verbrennungswärme bedeutet.

Versuche mit kolloiden Metallen zum Studium der Funktionsweise der Nieren.

Von

J. Voigt (Göttingen) und **M. Fritz** (Wildungen).

(Eingegangen am 2. April 1921.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

In ähnlicher Weise wie für das kolloide Silber und Jodsilber hatte ich (V.) beabsichtigt, auch das Schicksal anderer kolloider Metalle im Säugetierorganismus zu studieren. Verschiedene Gründe, darunter besonders die Papierknappheit und der Mangel an Versuchstieren, zwingen mich, zunächst diesen Plan aufzugeben, obgleich schon reichliches Material zur Bearbeitung vorliegt. Die vorläufige Durchmusterung desselben ließ gerade in den Nierenschnitten auffallende Verschiedenheiten erkennen und gab Veranlassung, diesem Punkte größere Aufmerksamkeit zuzuwenden. Die bei eingehenderer Untersuchung erhobenen Befunde erschienen für die Kenntnis der Nierenarbeit von Bedeutung, und Herr Dr. Fritz, der die Freundlichkeit hatte, die Präparate mit mir durchzusehen, bestätigte diese Ansicht. Wir haben uns deshalb entschlossen, unsere Beobachtungen an dem zur Zeit zur Verfügung stehendem Material als einen Beitrag zur Kenntnis der Nierenfunktion zu veröffentlichen. Wir beschränken uns mit Rücksicht auf die Papiernot darauf, nur eine Anzahl von besonders wichtig erscheinenden Beobachtungen mitzuteilen. Auch sonst müssen wir uns so kurz wie möglich fassen und bemerken deshalb schon hier, daß nur die für unsere Fragestellung wichtigen Bilder genauer beschrieben sind. Im übrigen hat sich uns auch bei diesen Untersuchungen wieder die Beobachtung im Dunkelfeld als ausgezeichnetes Hilfsmittel bewährt und oft noch da Metallablagerungen feststellen lassen, wo solche mit durchfallendem Licht wegen ihrer Feinheit nicht oder nur schwer wahr-

nehmbar waren. Wir haben uns ferner trotz der hohen Kosten entschlossen, die wichtigsten Bilder in mikrophotographischer Wiedergabe der Arbeit beizufügen, da diese eine weit bessere Vorstellung geben, als eine ausführliche Beschreibung es vermöchte, vergleiche zu Versuch 7 und 10 diese Zeitschr. Bd. 68.

Versuch 1: Chlorsilber. Ein mittelgroßes Kaninchen erhielt 5 ccm frisch bereiteten Chlorsilbers von ca. 0,04% AgCl-Gehalt intravenös injiziert und wurde 24 Stunden nach der Injektion getötet und obduziert. Die Nieren wiesen keine wesentlichen Veränderungen auf, schienen im ganzen vielleicht etwas blutreicher als normal.

Bei der mikroskopischen Untersuchung im Hellfeld sieht man an einzelnen Stellen im Gebiet der gewundenen Harnkanälchen wenige, in dem der geraden hie und da Erscheinungen einer beginnenden Koagulationsnekrose, dazwischen finden sich jedoch Partien von durchaus normalem Aussehen. Die Gefäße, besonders die Venen, erscheinen an vielen Stellen stark gefüllt, auch die Spalträume zwischen den geraden Harnkanälchen und besonders auch im Bereich der Sammelröhrchen heben sich stellenweise durch starke Füllung gegen ihre Umgebung ab.

Im Dunkelfeld sieht man, anscheinend regellos zerstreut, in der Rindensubstanz Ablagerungen leuchtender Partikelchen. Es stellt sich jedoch bei genauerer Betrachtung heraus, daß es sich hier wohl ausnahmslos um die Umgebung von Gefäßen handelt. An vielen Stellen ist das Lumen des Gefäßes direkt im Schnitt getroffen. Es erscheint mehr oder weniger stark mit leuchtenden Partikelchen gefüllt; besonders zahlreich aber finden sich solche in der allernächsten Umgebung. Es ist dabei zu beobachten, daß bald in einzelnen anliegenden Harnkanälchen das Epithel — besonders an der zugewandten Seite — mit feinen leuchtenden Teilchen angefüllt ist. Zum Teil erstrecken sich diese Ablagerungen auch etwas weiter von der Gefäßwand hinweg in das Nierengewebe. Außer den Harnkanälchen, deren Epithel mit Metallteilchen beladen ist, finden sich solche, deren Membrana propria ganz deutlich mit allerfeinsten Silberteilchen imprägniert ist und in mattbläulich silbernem Glanz schimmert (Abb. 1). Die letztere Erscheinung kann man jedoch eigentlich nur in der Nachbarschaft eines großen Gefäßes deutlich beobachten. Bei kleineren scheint sie hie und da angedeutet, jedoch nirgends so schön ausgebildet. In den Spalträumen zwischen den übrigen Harnkanälchen sieht man an einzelnen Stellen leuchtende Teilchen in geringerer Anzahl. Im allgemeinen hat man jedoch den Eindruck, als ob 24 Stunden nach der Injektion das Chlorsilber bereits im wesentlichen aus diesen Bahnen geschwunden sei. Im Gebiet der Sammelröhrchen und der Ausführungsgänge sind auch im Dunkelfeld keinerlei Besonderheiten festzustellen.

Versuch 2: Kupfer (v. Heyden). Ein Kaninchen erhielt 14 ccm einer 0,08 proz. kolloiden Kupferlösung intravenös injiziert und wurde 24 Stunden nach der Injektion getötet und obduziert. Die makroskopische Untersuchung der Nieren ergab keinen pathologischen Befund.

Bei der Untersuchung im Hellfeld fallen zunächst im gefärbten Präparat Veränderungen an gewundenen und geraden Kanälchen auf, die als beginnende Koagulationsnekrose zu deuten sind. In den Glomerulusschlingen findet man, bald mehr, bald weniger, schwarze Teilchen, die dem Verlauf der Glomerulusschlingen entsprechend angeordnet erscheinen. In größerer Menge finden sich diese Teilchen in den Gefäßen der Rindensubstanz, von den Venae stellatae angefangen; sie sind stark mit Blut gefüllt. An einzelnen Stellen erscheint das Lumen davon wie von einer einheitlichen Masse ausgefüllt zu sein, doch fehlen alle Zeichen für einen Gerinnungsvorgang. Wie bereits erwähnt, finden sich im Blut zahlreiche

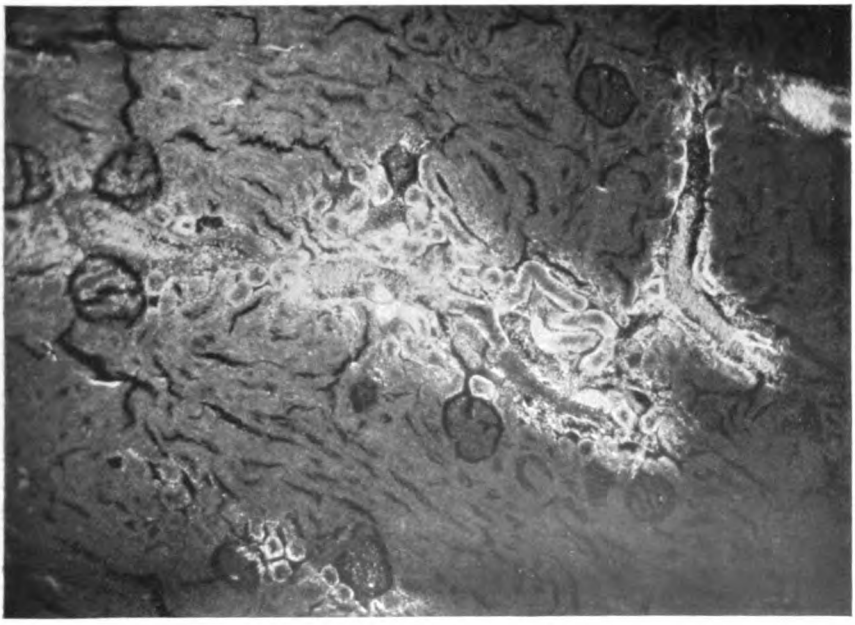


Abb. 1.

feine, vereinzelt gröbere schwarze Metallpartikelchem. Sehr auffallend ist die Tatsache, daß die Harnkanälchen in der Umgebung dieser Gefäße an der ihnen zugewandten Seite im Epithel massenhaft Ablagerungen von feinen schwarzen Partikelchen aufweisen. Auf der Grenze zwischen Mark und Rindenschicht finden sich dem Gefäßverlauf entsprechend zwischen ganz normalen Partien Züge von Harnkanälchen, deren Epithelien stark mit Metallteilchen angefüllt sind. Zum Teil sieht man die Gefäße selbst im Schnitt getroffen, so daß man auch bei jenen Kanälchen ein Gefäß als benachbart annehmen darf, bei denen es im Schnitt nicht oder nur undeutlich zu sehen ist. Im Gebiet der Sammelröhrchen werden dann allmählich die Ablagerungen spärlicher, um dann plötzlich ganz zu verschwinden.

Bei der Untersuchung im Dunkelfeld finden wir die Beobachtungen aus dem Hellfeld bestätigt. In der Rindensubstanz sind nur in der Umgebung der Gefäße ganz wenige Harnkanälchen an ihrer ganzen Peripherie mit Metallteilchen beladen; die dem Gefäß zugewandte Seite erscheint jedoch im Epithel überall bald mehr, bald weniger zahlreiche Metallteilchen zu enthalten. Dadurch, daß die abgekehrten Teile der Epithelien oft unbeteiligt sind, erhält man halbmondförmige Gebilde. In größerer Entfernung von den Gefäßen sind die Harnkanälchen frei von Ablagerungen.

An der Grenze zwischen Mark und Rindensubstanz und an den in das Mark hineinziehenden Streifen (s. oben) erscheinen im Dunkelfeld die

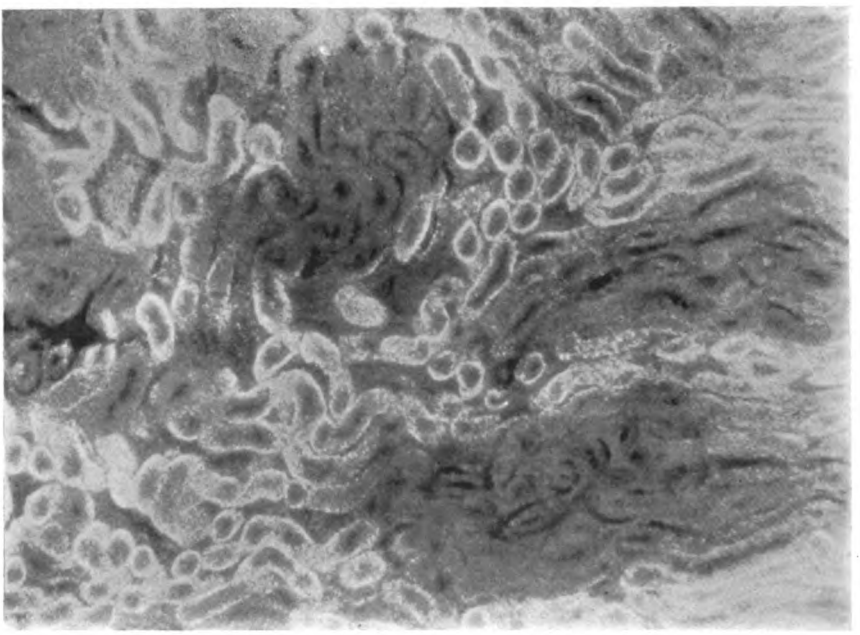


Abb. 2.

Harnkanälchen im Epithel etwas gleichmäßiger mit Metallteilchen beladen zu sein (s. Abbildung). Im übrigen tritt der eigentümliche Verlauf der beteiligten Harnkanälchen hier noch deutlicher als im Hellfeld in Erscheinung, indem der Grenzschicht entsprechend sich zunächst eine eigenartige maschenförmige Anordnung findet. (Abb. 2). Diese Maschen werden gebildet aus Kanälchen, deren Epithel mit leuchtenden Teilchen beladen ist und offenbar Blutgefäße begleiten, während sich zwischen ihnen andere Kanälchen befinden, welche keinerlei Ablagerungen zeigen. Ins Mark hinein verlaufen dann annähernd parallel gerichtete und ziemlich gleichmäßig voneinander entfernte Züge von Sammelröhrchen, deren Epithel mit hellleuchtenden Teilchen erfüllt ist. Die Ablagerungen in diesen Kanälchen werden in deren Verlaufsrichtung etwas weniger dicht und hören dann

plötzlich etwa in der gleichen Höhe auf. An einzelnen Kanälchen kann man deutlich sehen, daß dieses ziemlich plötzliche Abklingen des Leuchtens nicht etwa an einer Umbiegungsstelle erfolgt, sondern im geraden Verlauf der Kanälchen. Mehr papillenwärts findet man im Lumen der Sammelröhrchen an vielen Stellen abgestoßene Epithelien, in denen nicht selten stärker lichtbeugende Teilchen wahrnehmbar sind.

Versuch 3: Wismut (v. Heyden). Ein mittelgroßes Kaninchen erhielt 14 ccm einer 1 proz. kolloiden Wismutlösung, also 0,14 g Wismut. Das Tier ist 2 Stunden nach der Injektion gestorben und kurz darauf obduziert. Makroskopisch waren keine wesentlichen Veränderungen zu beobachten.

Es fehlen bei der Untersuchung im Hellfeld gröbere Veränderungen. Die Gefäße in der Rinde und auf der Grenze zwischen Mark und Rinde, vor allem die Venen sind stark mit Blut gefüllt. Man erkennt neben dem normalen Inhalt zahlreiche gröbere und feinere schwarze Teilchen. In der Marksubstanz erscheinen vielfach auch die Gefäßspalten strichweise stärker mit Blut gefüllt. In den Ausführungsgängen ist das Epithel fast durchweg im Zusammenhang von der Wand abgelöst (Artefakt). In der Umgebung der stark gefüllten Gefäße zeigt das Epithel der anliegenden Harnkanälchen zahlreiche schwarze, gröbere und feinere Einlagerungen, und zwar scheinen die nächstliegenden am stärksten beteiligt. An einzelnen gewundenen Kanälchen finden sich Zeichen eines desquamativen Katarrhes. An der Grenze zwischen Mark und Rinde und in der Markschicht selber sind die Ablagerungen zahlreicher, doch scheinen auch hier einzelne Partien ganz unbeteiligt zu sein. In der Papille treten nach der Spitze hin zunehmend wieder Zeichen desquamativen Katarrhes und damit zugleich auch feine schwarze Niederschläge auf, die besonders deutlich in den abgestoßenen Epithelien erscheinen.

Bei der Untersuchung im Dunkelfeld findet man die Glomeruli vollkommen unbeteiligt, einzelne auf ihnen lagernde gröbere, leuchtende Teilchen sind offenbar mit dem Messer aus der Umgebung dorthin verschleppt worden. In der Rindenschicht finden sich ausschließlich in allernächster Nähe stärkerer, radiärer Gefäße leuchtende Kanälchen in Quer- und Schrägschnitten. Bei den weniger stark schimmernden Kanälchen bekommt man hie und da den Eindruck, als leuchte die Propria selber. Starke Vergrößerung löst aber den feinen Streifen in eine Reihe sehr kleiner glänzender Pünktchen auf; von einer Imprägnierung der Membran kann jedenfalls nicht die Rede sein. Die Epithelien enthalten bald mehr, bald weniger leuchtende Metallpartikelchen; an einzelnen Stellen finden sich diese vorzugsweise auf der dem Gefäß zugewandten Seite, während die gegenüberliegende fast oder vollständig frei bleibt. Auf der Grenze zwischen Mark und Rinde, wo sich die Gefäße verzweigen, nimmt die Zahl der Kanälchen, deren Epithel mit leuchtenden Teilchen erfüllt ist, beträchtlich zu; ihre strang- und maschenartige Anordnung ist auch hier deutlich zu erkennen. Im Gegensatz zu dem mit Kupfer injizierten Tiere erscheint hier das Epithel aller Kanälchen dieser Zone mit Metallteilchen beladen, aber einzelne Stränge treten infolge des hellen Scheines, der durch die Menge

der in ihrem Epithel abgelagerten Partikelchen bedingt ist, gegen ihre Umgebung hervor. Es folgt nun eine scharfe Grenze, an welcher die stärkere Ablagerung in einzelnen Kanälchen aufhört, und die Sammelröhren erscheinen gleichmäßig ziemlich schwach mit Metallteilchen beladen. Papillenwärts folgt nun eine Zone, in welcher sich leuchtende Ablagerungen nur in den Epithelien ganz vereinzelter Sammelröhrchen finden. Auch das Epithel der Ausführungsgänge weist zunächst keinerlei Metallteilchen auf, diese treten erst in ihrem weiteren Verlaufe auf. Nach der Spitze der Papille hin finden sich diese vorzugsweise in den abgestoßenen und im Lumen liegenden Epithelien (s. oben).

Versuch 4: Mangan. (v. Heyden.) Ein mittelgroßes Kaninchen erhielt 15 ccm einer 0,07 proz. kolloiden Manganlösung, also 0,01 g Mangan, in die Ohrvene injiziert. Es wurde 24 Stunden nach der Injektion getötet und obduziert. Die Nieren wiesen keine gröberen Veränderungen auf.

Im durchfallenden Licht sind kaum Abweichungen vom normalen Befund zu beobachten. Das Protoplasma der Epithelien verschiedener gewundener und gerader Harnkanälchen sowie Sammelröhrchen erscheint leicht getrübt. Die Gefäße der Rindensubstanz sind stark mit Blut gefüllt; zwischen den Blutkörperchen sieht man einzeln oder zu größeren Flocken zusammengeballt schwarze Teilchen. An einigen Stellen — es scheint sich hierbei um die größeren Venen zu handeln — sieht man an der zugewandten Seite der benachbarten Harnkanälchen in den Epithelien feine schwarze Körnchen liegen. Diese Ablagerungen sind wiederum nach der Basis der Epithelien am dichtesten. Nur an ganz wenigen Stellen erreichen die Ablagerungen das Epithel der gegenüberliegenden Seite der Kanälchen; die erste Reihe von Harnkanälchen wird nie überschritten.

Im Dunkelfeld fallen in der Rinde sofort die großen Venen und ihre Umgebung auf: zahlreiche leuchtende Partikelchen liegen im Gefäß selber und im Epithel der benachbarten gewundenen und geraden Kanälchen. Die Verteilung entspricht dem Bilde im durchfallenden Licht, nur sind im auffallenden erheblich mehr und feinere Teilchen sichtbar. An einzelnen Stellen zeigt das Epithel gewundener und gerader Kanälchen einen geringen grauweißen Schimmer, der den übrigen fehlt. Bei ganz starker Vergrößerung scheint er durch ganz feine Teilchen, die etwa die Mitte der Zellen einnehmen, bedingt zu sein. In den Gefäßspalten finden sich streckenweise ganz feine leuchtende Teilchen. Auf der Grenze zwischen Mark und Rindensubstanz begegnen wir wieder den Sammelröhrchen, deren Epithel eine Strecke weit, besonders an der Zellbasis, deutlich leuchtende Partikelchen enthält; auch hier hört der schimmernde Inhalt plötzlich an einer geraden Grenze auf.

Versuch 5: Kolloides Eisen (v. Heyden). Ein mittelgroßes Kaninchen erhielt 14 ccm einer 0,06 proz. kolloiden Eisenlösung, also ungefähr 0,0085 g Eisen, intravenös injiziert. Es wurde 24 Stunden nach der Injektion getötet und obduziert. Die Nieren wiesen makroskopisch keine wesentlichen Veränderungen auf.

Hellfeld: In der Rindenschicht finden sich in unregelmäßiger Verteilung über den ganzen Schnitt ausgedehnt Herde mit Zeichen von Schä-

digung der Epithelien. Die Kerne sind schlecht gefärbt, das Protoplasma gequollen und fein granuliert, die Zellgrenzen undeutlich. Im Bereich der Sammelröhrchen sind die Kerne aber im allgemeinen wieder gut gefärbt, doch weisen einzelne von ihnen die gleichen Veränderungen auf. Hie und da zeigt sich in den Saftlücken ein gelbbräunlicher Niederschlag.

Dunkelfeld: Im ganzen dürften die Epithelien der Rindenschicht keine Ablagerungen von Metallteilchen enthalten; sie erscheinen zwar granuliert, es fehlt den Körnchen jedoch das für feinste Metallteilchen charakteristische Leuchten. Einzelne Kanälchen lassen aber eine Strecke weit deutlicher hervortretende, etwas lebhafter leuchtende Partikelchen in ihrem Protoplasma erkennen. Bei diesen Epithelien scheint der innere Rand fast völlig von diesen Teilchen frei zu bleiben. Die Gefäßspalten zwischen den gewundenen und geraden Harnkanälchen sind an verschiedenen Stellen mit leuchtenden, recht feinen Teilchen besetzt, zuweilen kann man auch solche finden, die längs vom Schnitt getroffen in ganzer Länge reichlich mit leuchtenden Partikelchen angefüllt sind. Auf der Grenze zwischen Mark und Rinde finden sich auch hier wieder Sammelröhrchen, deren Epithelien eine Strecke weit mit deutlich leuchtenden Teilchen durchsetztes Protoplasma aufweisen; und zwar erscheint besonders der Basalteil der Epithelien mit ganz feinen, lichtbeugenden Teilchen angefüllt. Diese Ablagerung verschwindet auch wieder in einer bestimmten Höhe wie abgeschnitten.

Versuch 6: Kolloides Gold. Ein kleines graues Kaninchen von ca. 0,7 kg Gewicht erhält am 28. VII. 1913 10 ccm eines 10fach konzentrierten stabilisierten Goldhydrosols mit einem Gehalt von 4,86 mg Au intravenös injiziert, am 32. VII. 20 ccm derselben Lösung mit einem Gehalt von 8,33 mg Au. Darauf war das Tier weniger munter, fraß jedoch ganz gut. 6 Stunden nach der Injektion wurde es getötet und obduziert. Die Nieren zeigten reichlich kleine Blutungen unter der Kapsel.

Bei der Untersuchung im Hellfeld bemerkt man zunächst die starke Füllung der Glomerulusschlingen und der Gefäße im Bereich der Rinde. Die Epithelien der Harnkanälchen sind im allgemeinen gut erhalten, die Kerne durchweg gut gefärbt, nur an einzelnen Stellen sind die Grenzen zwischen den Epithelien nicht deutlich zu erkennen, und ihr Protoplasma erscheint trübe. In manchen von den Tub. cont. findet sich ein fein granulierter Inhalt. An den Henleschen Schleifen erkennt man vielfach die Zeichen eines desquamativen Katarrhes. Dazwischen sieht man Züge von geraden Kanälchen von durchaus normalem Aussehen. Auf der Grenze zwischen Mark und Rinde finden sich zahlreiche Quer- und Schrägschnitte von größeren Gefäßen (Venen), die alle strotzend mit Blut gefüllt sind; an einzelnen Stellen ist es zu kleinen Blutungen ins Gewebe gekommen. Auch in dieser Zone und weiter noch im Bereich der Sammelröhrchen sieht man ganz normale und krankhaft veränderte Harnkanälchen miteinander wechseln; weiter zur Papille hin, im Gebiet der Ausführungsgänge sind keine Veränderungen wahrnehmbar.

Bei der Betrachtung im Dunkelfeld treten die Epithelien mit dem getrübten Protoplasma deutlich hervor und heben sich durch ihren matten

Silberglanz gegen die übrigen ab. Auch der Inhalt der Harnkanälchen ist deutlich lichtbeugend. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man im Protoplasma der hellschimmernden Epithelien feine, silberglänzende Teilchen, die auf Zusatz von $^1/_2\%$ Cyankaliumlösung verschwinden; auch der schimmernde Inhalt der Kanälchen verliert daraufhin seinen Glanz. Während in der Grenzzone zwischen Rinde und Mark sich diese Ablagerungen in den Epithelien noch ziemlich zahlreich finden, verschwinden sie papillenwärts vollständig, der Inhalt der Kanälchen resp. Sammelröhrchen behält dagegen seinen silbernen Glanz. Sehr auffallend ist jedoch das Bild, welches sich in der Papille bietet. Die großkalibrigen Ausführungsgänge mit ihrem

Abb. 3.

hohen Epithel weisen keinerlei Veränderungen auf, sind aber von einem bläulich-silbern schimmernden Ring umgeben. (Abb. 3.) Das Gewebe, in dem diese Ablagerungen stattgefunden haben, ist, wie der Vergleich mit Präparaten zeigt, die mit Cyankaliumlösung behandelt worden sind, sonst nicht von dem übrigen Zwischengewebe zu unterscheiden. Bei stärkster Vergrößerung bekommt man den Eindruck, als ob es sich hier um ein System feinster Kanälchen handelt, die spinnwebartig die Ausführungsgänge umgeben und mit einer Menge sehr feiner lichtbeugender Teilchen angefüllt sind. Wie bereits oben bemerkt, verschwinden auch diese Ablagerungen auf Zusatz von $^1/_2\%$ Cyankaliumlösung.

Die bisher beschriebenen Bilder stammen, wie schon bemerkt, von einzelnen Versuchen; sie gestatten gewisse Rückschlüsse auf den Funktions-

mechanismus der Niere, da sich immerhin einige Übereinstimmungen zwischen mehreren dieser Versuche finden. Ehe wir den Versuch machen, die mikroskopischen Befunde für die Kenntnis der Nierenfunktion nutzbar zu machen, wollen wir noch eine Reihe von Präparaten beschreiben, die aus Versuchsserien stammen. Die ganze Reihe der verschiedenen Befunde zu schildern, haben wir uns aus Gründen der Platzersparnis versagen müssen und nur einzelne, besonders wichtig erscheinende, geschildert. Betreffs der übrigen verweise ich auf meine Untersuchungen über das Schicksal des kolloidalen Silbers und des kolloidalen Jodsilbers in der Biochemischen Zeitschrift.

Versuch 7: Silber. Ein starkes Kaninchen erhielt an 3 aufeinanderfolgenden Tagen zweimal je 10 ccm und einmal 20 ccm der stabilisierten, nicht isotonischen 0,66 proz. Lösung Kollargol (264 mg Ag — 90 mgr pro kg) in die Ohrvene injiziert; am 4. Tag wurde das Tier getötet. Die Niere zeigte makroskopisch auf dem Durchschnitt der Rindensubstanz entsprechend ein glasiges Aussehen und grüne Verfärbung.

Bei durchfallendem Licht erscheinen die Glomeruli unverändert, zeigen aber zum größten Teil braunschwarze, bald feine, bald gröbere Auflagerungen. An einzelnen Schaltstücken ist das Protoplasma der Epithelien fein gekörnt, die Zellen erscheinen dort etwas gequollen, die Kerne schlecht gefärbt. Im Gebiet der gewundenen Harnkanälchen treten zwischen Bündeln unveränderter Röhrchen andere auf, bald einzeln, bald in Gruppen liegend, an denen der oben beschriebene Prozeß der Trübung des Protoplasmas, Aufquellung der Zellen und schlechte Kernfärbung sehr deutlich ausgeprägt ist. Die gleichen Veränderungen finden sich auch im Gebiet der Sammelröhrchen, und zwar in deren Anfangsteilen; beachtenswert erscheint, daß hier die Zellen sich gegen das Lumen vorwölben. Zwischen den einzelnen Epithelien bleibt eine schmale, aber deutlich erkennbare Zone von Ablagerungen frei; sie gewähren dadurch ein eigentümlich gefeldertes Aussehen. Die Kernfärbung scheint hier gelitten zu haben, wenigstens gelingt es nur an wenigen Stellen, Epithelkerne wahrzunehmen. Zwischen diesen veränderten, mehr oder weniger geradlinig verlaufenden finden sich ganz unveränderte Sammelröhrchen mit gutgefärbtem Kern und unverändertem Protoplasma. Nach der Papille zu hören die Ablagerungen in den Sammelröhrchen ganz unvermittelt auf. An vielen Stellen kann man dieses Aufhören im Verlauf des längs getroffenen Abschnittes wahrnehmen. Dabei ist besonders auffallend, daß hier offenbar eine bestimmte Grenze im Organ verläuft, welche die Ablagerungen nicht überschreiten.

Im Dunkelfeld erscheinen die Ablagerungen in den Glomerulis gelblich schimmernd, die in der Umgebung sich findenden gröberen Partikelchen sind als Verunreinigungen zu betrachten. Das Epithel der im durchfallenden Licht granuliert erscheinenden geraden und gewundenen Kanälchen erweist sich als mit feinen silbrig leuchtenden Partikelchen beladen, welche anscheinend von der Basis her bald mehr, bald weniger weit das Protoplasma durchsetzen. Seine Begrenzung nach dem Lumen zu erscheint deshalb leicht als Wellenlinie. Die in den Epithelien der

Sammelröhrchen sich findenden Niederschläge erscheinen merklich gröber und haben einen gelben Schimmer. Merkwürdig ist die Tatsache, daß die Epithelien auch nach den Seiten hin nicht gleichmäßig mit Metallteilchen angefüllt sind, sondern einen von diesen freibleibenden Rand aufweisen. Das bereits geschilderte gefleckte Aussehen, daß im Dunkelfeld besonders schön hervortritt, ist dadurch bedingt.

Versuch 8: Silber. Um festzustellen, ob die eben beschriebenen Bilder sich nur dann finden, wenn der Körper gewissermaßen mit kolloidem Silber überschwemmt wird, erhielt ein mittelgroßes Kaninchen 11 mg kolloides Silber intravenös injiziert und wurde 3 Tage später getötet. Makroskopisch erschienen die Nieren normal. Bei der Untersuchung im Hellfeld weisen die Epithelien verschiedener gewundener und gerader Harnkanälchen eine eigentümliche Streifung auf. In Verbindungsstücken und Sammelröhrchen erscheint das Epithel hie und da deutlich getrübt. Im Dunkelfeld zeigen die erwähnten Kanälchen in ihrem Epithel einen deutlichen silbernen Schimmer, der durch ganz feine nur mit stärkster Vergrößerung wahrnehmbare Teilchen bedingt wird. Da auch hier die Randzonen frei bleiben, finden wir auch hier das gefleckte Aussehen dieser Kanälchen. Beachtenswert erscheint, daß im Bereich der Sammelröhrchen bei diesem Versuche die Ablagerungen fehlen.

Versuch 9: Silber. Wie der vorige, doch wurde das Tier erst nach 5 Tagen getötet und untersucht; makroskopisch erschienen die Nieren durchaus normal. Im Hellfeld findet man bei stärkerer Vergrößerung das Epithel zahlreicher gewundener und gerader Harnkanälchen deutlich getrübt, an einzelnen Stellen ist ein mehr streifiges Aussehen bemerkbar. Hie und da ragen Epithelien halbkugelig in das Lumen vor. Im Dunkelfeld sind im Bereich der gewundenen und geraden Kanälchen lichtbeugende Ablagerungen, von geringen Spuren abgesehen, nirgends wahrzunehmen, dagegen finden sich hier solche im Grenzgebiet zwischen Rinde und Mark. Hier enthält das Epithel einer Anzahl von Sammelröhrchen eine Menge sehr feiner lichtbeugender Teilchen. Zuweilen haben diese Zellen nur einen gleichmäßigen mattsilbernen Glanz, aber auch hier gelingt es mit stärkster Vergrößerung, feinste Einzelteilchen zu erkennen. Die Anordnung dieser Teilchen im Protoplasma ist die gleiche wie bei den beiden vorhergehenden Versuchen.

Versuch 10: Silber. Ein starkes Kaninchen erhielt innerhalb 14 Tagen 6mal je 5 ccm 0,6proz. Kollargollösung intravenös. 8 Tage nach der letzten Injektion wurde es zur Untersuchung getötet. Die Nieren zeigten auf dem Durchschnitt eine dunkelbraune Randzone; es folgten dann eine dunkel olivgrüne, dann eine speckig weiße Zone und schließlich die olivgrüne Papille. Im Hellfeld erkennt man in der Rinde im normalen Gewebe Strecken mit ungleichmäßig gefärbten Kernen, dabei erscheint aber unter der Kapsel eine Zone ganz normalen Gewebes zu liegen. In den pathologisch veränderten Bezirken erkennt man mit starker Vergrößerung Zeichen von Koagulation, auch feine Granulierung des Protoplasmas in den Epithelien; sie finden sich fast ausschließlich in der Rinde, lassen sich nur an wenig Stellen in die Marksubstanz hineinverfolgen. Bemerkenswert ist der Um-

stand, daß die Membrana propria stellenweise, besonders an der Grenze zwischen Mark und Rinde, eine eigentümlich gelbbraune Färbung aufweist. In den Gefäßspalten zwischen den Kanälchen sieht man hie und da feine schwarze Körnchen liegen. Im Dunkelfeld erscheinen vereinzelte Kanälchen der Rindenschicht, sowohl gewundene wie gerade, von einer bläulich silbern schimmernden Linie eingefaßt, die der Membrana propria entspricht. Außerdem enthalten die Spalträume stellenweise reichlich feine leuchtende Partikelchen. Auch erscheinen einzelne Stränge gerader Harnkanälchen auf ihrer Außenseite mit feinen silberglänzenden Teilchen besetzt, ohne daß hier die Propria merklich leuchtete. Nach der Markschicht zu

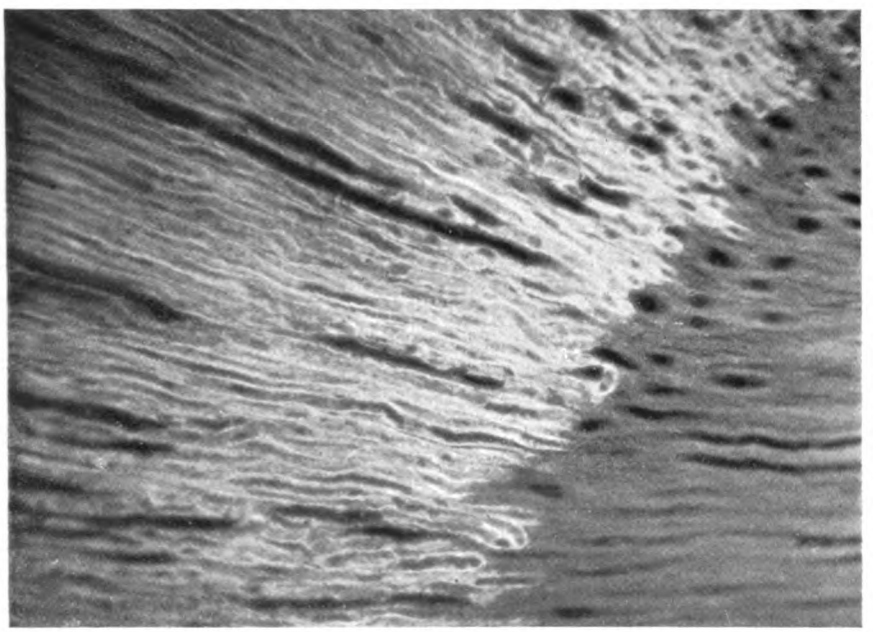


Abb. 4.

zeigen immer mehr Kanälchen den hellen Glanz der Propria, und im Gebiete der Sammelröhrchen ist dieser wohl an keinem einzigen zu vermissen. Dazu findet man in den Spalträumen zahlreiche schimmernde Partikelchen, und es ergibt sich daraus ein außerordentlich farbenprächtiges Bild. Dann aber hört, etwa der Mitte des Organs entsprechend, das Leuchten der Propria mit einem Schlage, man kann nur sagen, wie abgeschnitten auf. (Abb. 4.) Auch der Gehalt der Spalträume an schimmernden Teilchen wird jetzt auf einmal verschwindend gering. Im Gebiet der Papille tritt dann plötzlich ganz unvermittelt unter dem hohen Epithel der Ausführungsgänge die Propria wieder als feiner bläulich-silbern schimmernder Streifen auf. Zugleich scheinen auch wieder leuchtende Partikelchen in den Spalträumen in größerer Zahl aufzutreten. Bemerkt sei hier noch, daß auch

mit stärkster Vergrößerung in der schimmernden Propria Einzelteilchen nicht deutlich zu isolieren sind.

Versuch 11: Jodsilber. Ein starkes Kaninchen erhielt 5 ccm eines frisch bereiteten 0,1 proz. Jodsilberhydrosols intravenös injiziert. Nach 24 Stunden wurde das Tier getötet und sofort obduziert; irgendwelche makroskopischen Veränderungen wurden dabei nicht gefunden. Bei der mikroskopischen Untersuchung im Hellfeld fällt zunächst die ziemlich starke Füllung der Gefäße auf; auch die feinen Gefäßspalten treten, besonders im Gebiete der Sammelröhrchen vielfach als gelbliche Streifen hervor. Das Epithel der Harnkanälchen erscheint häufig getrübt, seine Kerne mangelhaft gefärbt. Am stärksten verändert scheint an einzelnen Stellen das Epithel gewundener Harnkanälchen, welche hie und da einen gequollenen Eindruck machen. Auch im Bereich der Sammelröhrchen ist eine Schädigung des Epithels noch zu erkennen, doch nimmt diese je näher nach der Papille zu, desto mehr ab. Im Dunkelfeld erscheint das ganze System der Gefäße, besonders der feineren bald mehr, bald weniger dicht mit schimmernden Teilchen erfüllt. In den Glomerulis kann man vielfach die Capillarschlingen als Ketten silbern schimmernder Teilchen erkennen, die Gefäßspalten zwischen den einzelnen gewundenen und geraden Harnkanälchen weisen solche gleichmäßig auf. Im Bereich der Tub. contorti schimmert die Propria hie und da in bläulich silbernem Glanz, der durch die Imprägnierung mit allerfeinsten Metallteilchen bedingt wird. In der Markschicht erscheinen die Sammelröhrchen an ihrer Außenseite bald mehr bald weniger dicht von den in den Spalträumen liegenden leuchtenden Teilchen bedeckt, so daß man sie gewissermaßen auch in mehr und weniger leuchtende unterscheiden kann. Man erhält so ein Bild, das — wenn auch durch ganz andere Vorgänge bedingt —, mit den früher beschriebenen eine Ähnlichkeit hat. Besonders auffallend ist aber die Tatsache, daß auch hier, wo es sich doch ausschließlich um Ablagerungen von Metallteilchen in den Gefäßspalten handelt, eine scharfe Grenze besteht, an welcher diese wie abgeschnitten aufhören. Dieser Befund ist um so beachtenswerter, als er ebenfalls Bildern zu entsprechen scheint, die bei anderen Versuchen durch Ablagerungen in den Epithelien oder in der Membrana propria bedingt wurden. — In der nun folgenden Zone, die etwa der Basis der Papille entspricht, ist die Zahl der Ablagerungen in den Spalträumen außerordentlich gering, näher nach der Spitze der Papille hin treten sie dann in immer größerer Zahl auf und beschränken sich nun nicht mehr auf die allernächste Umgebung der Ausführungsgänge, sondern erfüllen das ganze Maschenwerk des dazwischenliegenden Gewebes.

Versuch 12: Jodsilber. Ein mittelgroßes Kaninchen erhielt innerhalb einer Woche 0,36 g des v. Heydenschen kolloiden Jodsilbers (einschl. Schutzkolloid) in 32 ccm Wasser intravenös injiziert. 40 Tage nach der ersten Injektion wurde das Tier getötet und obduziert; die Nieren erschienen makroskopisch normal. Bei der mikroskopischen Untersuchung im Hellfeld findet man an einzelnen gewundenen Kanälchen Stellen, wo das Protoplasma der Epithelien etwas getrübt und körnig, der Kern schlechter gefärbt erscheint. Im Dunkelfeld fallen zunächst die größeren

Gefäße ins Auge, deren Inhalt mit feinen, stark leuchtenden Teilchen untermischt erscheint, auch die Intima scheint damit besetzt. Die Gefäßschlingen der Glomeruli lassen hie und da feine, oft zu Häufchen angeordnete Teilchen erkennen. Bei einer Anzahl von gewundenen Kanälchen, darunter den oben beschriebenen, schimmern die Epithelien mattsilbern. Diese leuchtenden Kanälchen liegen z. T. ganz vereinzelt in der Rindenschicht, z. T. sind sie zu Gruppen vereinigt. Bei schwächerer Vergrößerung hat man vielfach den Eindruck, als sei nicht das Epithel, sondern das Lumen der Kanälchen mit den lichtbeugenden Teilchen erfüllt, doch läßt sich mit starker Vergrößerung feststellen, daß sich diese in den Zellen nahe ihrem freien Rande befinden. Die ganze Erscheinung nimmt nach der Grenze zwischen Mark und Rinde allmählich an Ausdehnung und Intensität zu, obwohl der Schimmer immer verhältnismäßig matt bleibt. Auch im Bereich der Sammelröhrchen kann man noch eine Anzahl von solchen erkennen, deren Epithel einen helleren Schein hat als das der benachbarten, ohne daß es aber gelänge, hier Einzelteilchen zu erkennen. In den Gewebsspalten zwischen den Sammelröhrchen treten jetzt mehr rötlich glänzende, also gröbere Partikelchen in großer Zahl auf; sie begleiten sie bis zur Basis der Papille, wo sie zunächst erheblich spärlicher werden. Nach der Spitze der Papille hin werden die Ablagerungen dann immer zahlreicher, sie finden sich in dem maschigen Zwischengewebe, ganz besonders dicht gedrängt aber in der nächsten Umgebung der Ausführungsgänge, die stellenweise von einem Ring leuchtender Teilchen umscheidet sind.

Wenn wir die bei den verschiedenen Versuchen erhaltenen Bilder miteinander vergleichen, so treten uns zunächst erhebliche Verschiedenheiten entgegen, die bei gleicher Versuchsanordnung nur durch Unterschiede in der Löslichkeit und Giftigkeit der verwendeten Hydrosole begründet liegen können. Diese Frage soll uns hier jedoch nicht beschäftigen, wir wollen vielmehr versuchen, uns eine Vorstellung von der Aufgabe und Arbeitsweise einzelner Elemente der Niere auf Grund unserer Befunde zu machen. Dabei muß man sich hüten, zu weitgehende Schlüsse aus den in den Schnitten beobachteten Ablagerungen zu ziehen. Im allgemeinen scheint es geboten, sich dabei zu bescheiden, daß man das injizierte Metall in bestimmten Teilen oder Elementen des Organes nachweist.

Aus der größeren oder geringeren Zahl der Ablagerungen z. B. in einzelnen Epithelien kann man vielleicht einen Rückschluß auf die Menge des in ihnen enthaltenen Metalles ziehen; das gleiche wäre auch für die Größe der Niederschläge der Fall. Um da etwa die Gründe zu erwägen, weshalb einmal viele sehr feine, das andere Mal wenige und größere Teilchen wahrgenommen werden, müßte man schon auf Erfahrungen zurückgreifen, die beim Herstellen von Metallhydrosolen gemacht sind: Keim-

bildungen und Wachstumsgeschwindigkeiten; damit kommen wir aber in das Gebiet der Spekulation. Wie schon bemerkt, können wir in unseren Präparaten nicht mit Sicherheit entscheiden, ob die in ihnen wahrzunehmenden Metallablagerungen sich in dieser Form bereits im lebenden Organ finden, oder ob sie erst durch die reduzierende Wirkung des zum Fixieren verwendeten Formols oder ähnlichem entstanden sind.

Auch ist nicht immer im Schnitt festzustellen, in welcher Richtung die das Metall mit sich führende Flüssigkeit sich bewegt haben mag. Eindeutig sind in dieser Richtung die Befunde, welche nach der Injektion von koll. AgCl, Cu, Bi erhoben wurden, denn hier muß eine Diffusion von den Venen aus angenommen werden, da nur die diesen anliegenden Harnkanälchen in ihrem Epithel Metallniederschläge zeigen und diese sich vorzugsweise auf der dem Gefäß zugekehrten Seite zeigen. Bei Nr. 6 (Au) und Nr. 12 (AgJ) spricht die Tatsache, daß im Gewebe der Papille sich massenhaft Metallteilchen finden, dafür, daß auch der Mantel von solchen um die Ausführungsgänge einem gegen diese gerichteten Flüssigkeitsstrom entstammen. Bei Nr. 10 (Ag) und Nr. 11 (AgJ) ist wohl auch mit Sicherheit anzunehmen, daß der Weg zur Ablagerungsstelle von der Gefäßbahn nach dem Lumen der Harnkanälchen zu gerichtet gewesen ist, denn die Membrana propria bildet hier die Grenze, über welche hinaus die Metallniederschläge sich nicht verfolgen lassen. Daß sich in diesen beiden Versuchen die Propria mit feinsten Metallteilchen beladen erweist, ist wohl als eine Art Ultrafiltration aufzufassen und scheint nebenbei bemerkt dafür zu sprechen daß in diesen Fällen das Metall sich länger oder wieder im Zustande feinster Zerteilung befunden hat. In den Versuchen Nr. 5, 7, 8 und 9 ist nicht zu entscheiden, wie die metallführende Flüssigkeit in die Epithelien, hineingelangt ist; es liegt aber nahe, hier an einen Resorptionsprozeß vom Lumen der Kanälchen aus zu denken, da kein merklicher Gehalt der Spalträume an Metallteilchen zu erkennen ist. Das Vorkommen dieser Niederschläge in den Epithelien bei dem Fehlen solcher in den Gefäßspalten könnte natürlich auch so erklärt werden, daß zu dem Zeitpunkt, an dem das Tier getötet und die Niere fixiert wurde, aus der Gefäßbahn das Metall (Ag) bereits verschwunden war, während es sich in den Epithelien gewisser Harnkanälchen noch fand.

Von besonderer Wichtigkeit dürfte jedoch die Tatsache sein, daß bei fast allen Versuchstieren sich in der Markschicht eine ohne weiteres in die Augen fallende Grenze findet, jenseits der immer eine an Metallablagerungen auffallende arme Zone folgt. Wie bereits bemerkt, gilt das plötzliche Aufhören der Metallniederschläge nicht nur für solche in den Epithelien, wo es ja eventuell durch einen Funktionswechsel bedingt sein könnte, sondern auch für solche in der Membrana propria (Nr. 10) und sogar in den Gefäßspalten (Nr. 12). Hier von einer Zufälligkeit zu reden, geht wohl nicht an; auch die Schnittrichtung darf nicht verantwortlich gemacht werden, denn die Erscheinung wird durch diese in keiner Weise beeinflußt. Mag man sich Abschnitte der Präparate aufsuchen, wo die Sammelröhrchen längs, schräg oder quer vom Schnitt getroffen sind, immer findet man die scharfe Grenze. Für diese auffallende Tatsache eine einleuchtende Erklärung zu finden, dürfte schwer sein. Vielleicht ist es das Richtigste, sich zunächst mit der Feststellung zu begnügen, daß jenseits dieser Grenze das vielleicht vorhandene gelöste Metall durch dieselben Mittel nicht wahrnehmbar gemacht werden kann, welche in den übrigen Partien der Niere das Zustandekommen der Metallablagerungen bewirkten. Es soll hiermit vor allem ausgesprochen werden, daß es sehr wohl möglich, wenn nicht gar wahrscheinlich ist, daß für die verschiedenen Fälle verschiedenartige Vorgänge in Frage kommen können. Vielleicht ist es weiteren Versuchen beschieden, hier Klarheit zu schaffen; es wäre z. B. mit der Methode der Vitalfärbung unter Verwendung verschiedenartiger Farbstoffe dieser Frage weiter nachzugehen. Auch wäre daran zu denken, Versuche wie die oben beschriebenen in der Weise zu erweitern, daß man den Versuchstieren etwa Stoffe zuführte, durch welche die Reaktion oder Konzentration des Harnes beeinflußt wird.

Die Annahme, daß nicht alle Harnkanälchen gleichzeitig arbeiten sondern je nach Bedarf nur ein mehr oder weniger großer Teil von ihnen, steht in Analogie zu dem Verhalten der Capillaren. Wenn auch manche unserer Befunde (Nr. 5, 7, 8 und 9 z. B.) für ihre Richtigkeit sprechen würden, so geben andere Befunde Anlaß, an der Richtigkeit dieser Hypothese zu zweifeln. Ist es nicht auffällig, daß eine Reihe von Harnkanälchen schwere Schädigungen des Epithels aufweisen, während andere genau

derselben Ordnung vollkommen unversehrt erscheinen? Sodann erscheint aber auch die Tatsache unerklärlich, daß bei Nr. 10 in der Rindenschicht nur ganz vereinzelte Harnkanälchen eine Imprägnierung der Propria aufweisen; denn daß diese geringe Anzahl zur Zeit überhaupt nur in Tätigkeit gewesen sein sollte, ist nicht anzunehmen. Daß der Grund dafür aber an der geringen zur Verfügung stehenden Menge von Ag liegen sollte, erscheint ausgeschlossen, weil die Sammelröhrchen wohl ausnahmslos eine stark imprägnierte Propria aufweisen. Bei Nr. 1 finden wir zwischen Harnkanälchen, deren Epithel mit Metallteilchen beladen ist, andere, bei denen nur die Propria ganz feine Metallablagerungen zeigt. So scheinen also Vermutungen über eine selektive Funktion der Harnkanälchen nach unseren Befunden ebenfalls nicht ungerechtfertigt.

Von besonderem Interesse dürfte auch der Umstand sein, daß wir bei einem erheblichen Teile der hier beschriebenen Versuche immer wieder den Zeichen eines desquamativen Katarrhs begegnen. In einzelnen Fällen wiesen die in den abführenden Harnwegen sichtbaren abgestoßenen Epithelien deutlich Metallablagerungen auf. Berücksichtigt man daneben die von einem von uns (V.) bereits mitgeteilte Erfahrung, daß es selbst nach Injektion recht großer Mengen kolloiden Silbers nicht möglich war, innerhalb der nächsten 8 Tage im Urin analytisch eine Spur von Ag nachzuweisen — das Minimum würde 0,14 mg betragen, — so muß man annehmen, daß die Ausscheidung intravenös injizierter kolloider Metalle durch die Nieren in der Weise vor sich geht, daß sie mit den abgestoßenen Epithelien zusammen den Körper verlassen. Vielleicht gehen die durch Toxine verursachten Nierenschädigungen auf einen ähnlichen Vorgang zurück.

Aus diesen, zum Teil recht auffallenden Befunden weitgehende Folgerungen zu ziehen, dürfte verfrüht sein. Die relativ geringe Zahl der Versuche gestattet das nicht. Aber auch indem sie zeigen, daß solche Erscheinungen möglich sind — ob sie die Regel darstellen, ist zur Zeit nicht zu entscheiden, — dürften diese Befunde eine gewisse Bereicherung unserer Vorstellung von der Arbeitsweise und Aufgabe einzelner Elemente in der Niere bedeuten. Weitere Untersuchungen mit verschiedener Versuchsanordnung sind nötig.

Autorenverzeichnis.

Bachem, C. und H. Kriens. Über Jodabspaltung aus Jodoform und dessen Ersatzpräparaten. S. 230.

Feldsberg, Emil s. Fränkel.

Fränkel, Sigmund und Emil Feldsberg. Über eine neue Funktion des tryptischen Fermentes (Anhydrase) und über die Darstellung von d-Tyrosinanhydrid und d-Tryptophananhydrid aus den tryptischen Verdauungsprodukten. S. 218.

Fritz, M. s. Voigt.

Führer, H. Die Wirkungsstärke der Narkotica. I. Versuche am isolierten Froschherzen. S. 143.

Joachimoglu, Georg. Die Wirkung einiger Verwandten des Chloroforms mit besonderer Berücksichtigung der Traubeschen Theorie über die Wirkung der Narkotica der Fettreihe. S. 203.

Iwanoff, Nicolaus N. Über die Verwandlung stickstoffhaltiger Substanzen bei den Endphasen der Hefenautolyse. S. 1.

— Über Eiweißspaltung in Hefen während der Gärung. S. 25.

— Über den Einfluß der Gärungsprodukte auf den Zerfall der Eiweißstoffe in den Hefen. S. 62.

Kahho, Hugo. Zur Kenntnis der Neutralsalzwirkung auf das Pflanzenplasma. II. Mitteilung. S. 125.

Katsch, G. und Géza Németh. Über Alkaptonchromogene. S. 212.

Klein, P. s. Traube.

Klein, W. und Maria Steuber. Die elementaranalytische Methode der direkten Bestimmung von Kohlensäure und Sauerstoff in der Berthelotschen Bombe und ihre Bedeutung für Stoffwechselbilanzen speziell beim Herbivoren. S. 81.

Kriens, H. s. Bachem.

Meißner, R. Zur Beschleunigung der Blutgerinnung durch Euphyllin. S. 197.

Németh, Géza s. Katsch.

Sarin, E. Beiträge zur Chemie der Bildung und Reifung des Bienenhonigs. S. 250.

— Einfluß organischer Säuren auf die Bildung und Reifung des Zuckerhonigs. S. 259.

Schenker, Robert. Zur Kenntnis der Lipase von Aspergillus niger (van Tiegh.). S. 164.

Somogyi, R. Wirkung von Säuren auf die Hefegärung. S. 100.

— Quellung von Fibrin durch Säuren. S. 103.

— s. Traube.

Steuber, Maria s. W. Klein.

Traube, J. Ein neues Viscostalagmometer zur Bestimmung der Oberflächenspannung und Reibung für Flüssigkeiten von verschiedenster Reibung. S. 106.

— Nochmals die Wasserstoffionen. S. 108.

— und R. Somogyi. Zur Theorie der Desinfektion. S. 90.

— und P. Klein. Experimentelle Beiträge zur Theorie der Narkose. S. 111.

Voigt, J. und M. Fritz. Versuche mit kolloiden Metallen zum Studium der Funktionsweise der Nieren. S. 303.

Wachtel, Curt. Nachweis und Bestimmung des Morphins und anderer Alkaloide in tierischen Ausscheidungen und Organen. S. 265.

Wacker, Leonh. Kohlensäuredruck oder Eiweißquellung als Ursache der Muskelkontraktion? II. S. 284.

Verlag von Julius Springer in Berlin W 9

Soeben erschien:

Grundzüge der pharmazeutischen und medizinischen Chemie

für Studierende der Pharmazie und Medizin

bearbeitet von

Professor Dr. Hermann Thoms

Geheimer Regierungsrat und Direktor des Pharmazeutischen Instituts der Universität Berlin

Siebente, verbesserte und erweiterte Auflage

der „Schule der Pharmazie, Chemischer Teil"

Mit 108 Textabbildungen

Gebunden Preis M. 75.—

Vorwort:

Dem Verfasser des Buches „Chemischer Teil der Schule der Pharmazie" ist von Studierenden der Medizin, die das Werk als Grundlage ihres Universitätsstudiums benutzen, nahegelegt worden, es auch nach der medizinischen Seite hin noch weiter auszubauen. Das ist geschehen und dem Buch der Titel „Grundzüge der pharmazeutischen und medizinischen Chemie" gegeben worden. Es nimmt sowohl auf die wissenschaftlichen Bedürfnisse des studierenden Mediziners wie des Pharmazeuten Bezug, für letzteren sind aber noch besonders eingehend die Methoden der Darstellung und Prüfung der Arzneimittel berücksichtigt worden.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

Verlag von Julius Springer in Berlin W 9

Vor kurzem erschien:

Ultra-Strukturchemie

Ein leichtverständlicher Bericht

Von

Alfred Stock

Zweite, durchgesehene Auflage

Mit 17 Textabbildungen. Preis M. 12.— (und Teuerungszuschlag)

Aus den Besprechungen der ersten Auflage:

... Das behandelte Gebiet stellt wahrlich einen Wundergarten dar, und der Stocksche Bericht bildet in inhaltlicher, stilistischer sowie belehrender Hinsicht einen einzigartigen Führer, der bei aller Reichhaltigkeit mit feinem Verständnis nur das Bedeutsamste und dies in faßlicher Gestalt bringt. *(Berliner klinische Wochenschrift, Nr. 38, 1920.)*

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

SELECTE

11713